

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 03 AUG 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PCT115	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04182	国際出願日 (日.月.年) 26.06.00	優先日 (日.月.年) 25.06.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl. A61K9/127, A61K47/18		
出願人(氏名又は名称) テルモ株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

- ☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 7 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.01.01	国際予備審査報告を作成した日 17.07.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 内田 淳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3490	4P 2939

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-3, 5-11, 13-34 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 4, 12 ページ、 16.04.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 1, 4-16 項、 16.04.01 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 3, 17-19 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1, 2, 4-16	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1, 2, 4-16	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1, 2, 4-16	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1. JP, 9-263579, A

文献2. JP, 10-120595, A

請求の範囲1, 2, 4-16は、国際調査報告に引用された何れの文献にも記載も示唆もされていないから、新規性・進歩性を有する。文献1, 2には、塩基性化合物、ホスファチジン酸、他の膜構成脂質をを膜構成成分としうること、目的部位へのターゲッティングについて記載されているが、酸性化合物のモル比、式5, 6の化合物、脂肪酸を含有する点については、記載も示唆もされていない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

物質との相互作用は弱く、そのため、細胞やタンパク質などとの相互作用は少ないため、血液中でも安定であるが、炎症部位や腫瘍部位などのpHが低下した標的部位では、陰性荷電の物質との相互作用が増強されて、細胞親和性が向上し、標的部位に効率的に集積し、また、標的部位以外では集積が抑えられる結果、副

5 作用の軽減などの効果が期待される。

上記課題は以下の本発明により解決される。

(1) 本発明は、治療および／または診断を目的とする薬物を内包するリポソームであって、膜構成成分として、①塩基性化合物、②モル比が全リポソーム膜構成成分中の0.5～30mol%である、リン酸モノエステル誘導体
10 またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物から選択される酸性化合物、および③、①②以外のリポソーム膜構成成分からなるリポソームである。

(2) 本発明は、治療および／または診断を目的とする薬物を内包するリポソームであって、膜構成成分として、①塩基性化合物、②全リポソーム膜構成成分中の0.5～30mol%である、リン酸モノエステル誘導体または
15 カルボキシル基またはその塩を有する化合物から選択される酸性化合物、および③他のリポソーム膜構成成分からなり、炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位でpHが5～7の環境下において、能率的に集積するリポソームである。

(3) 本発明は、上記(1)に記載のリポソームであって、塩基性化合物のモル比が全リポソーム膜構成成分中1～30mol%であるリポソームである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

物であり、 X^{\oplus} は水素またはナトリウム、カリウムなどの医薬上許容されるカチオンを表わす。脂肪酸としては、リポソームの構造安定を損なうものでなければ特に限定されない。具体的には、天然または合成の、オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸、リノレン酸等があげられる。

- 5 リン酸モノエステル誘導体またはカルボン酸誘導体である酸性化合物の量は、全リポソーム膜構成成分中の0.5～30mol%である。この範囲であると、pHが5～7の炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位への集積性が向上する。

本発明は、リポソーム膜構成成分として①塩基性化合物に加えて②特定の酸性化合物を加えることが特徴であり、従来、脂質として使用されているホスファチ

- 10 ジルコリンはリン酸ジエステル化合物ではあるが、1分子の中に酸性基と塩基性基を有する双性イオン性化合物なので生理的pH付近で中性である。

前記塩基性化合物および前記酸性化合物を除く、他のリポソーム膜構成成分としては、リン脂質やコレステロール等のステロールがあげられる。リン脂質としては、例えばホスファチジルコリン（レシチン）、ホスファチジルグリセ

15 ロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィアングミエリン、カルジオリピン等の天然または合成のリン脂質、これらを常法に従って水素添加したものが挙げられる。

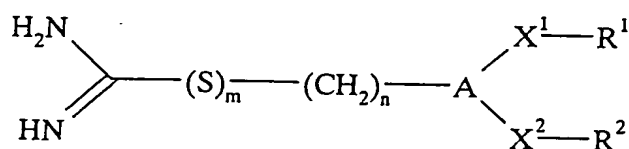
- 本発明のリポソーム膜は、さらに安定化剤を含んでもよく、例えば、膜流動性を低下させるコレステロール等のステロール、グリセロール、シュクロース等の
- 20 糖類が挙げられる。酸化防止剤は、例えば、トコフェロール同族体、即ち、ビタミンEが挙げられる。トコフェロールには α 、 β 、 γ および δ の4個が異性

THIS PAGE BLANK (USPTO)

請 求 の 範 囲

1. (補正後) 治療および／または診断を目的とする薬物を内包するリポソームであって、リポソーム膜構成成分として、①塩基性化合物、②モル比が全
5 リポソーム膜構成成分中の0.5～30mol%である、リン酸モノエステル誘導体
またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物、およ
び③、①②以外のリポソーム膜構成成分を含有し、pHが5～7の病巣部位に集
積するリポソーム。
2. 前記塩基性化合物のモル比が、全リポソーム膜構成成分中の1～30mol%
10 である請求項1記載のリポソーム。
3. (削除)
4. (補正後) 前記塩基性化合物が、下記式1から4のいずれかで示される塩
基性化合物である請求項1、2のいずれかに記載のリポソーム。

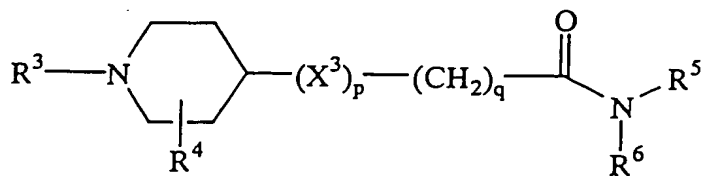
15



式1

- (式1中、Aは芳香環を表す。R¹及びR²は炭素数10～25のアルキル
基またはアルニケル基を表し、R¹およびR²は同一であっても異なっ
20 いてもよい。X¹およびX²は—O—、—S—、—COO—、—OCO—、
—CONH—またはNHCO—を表し、X¹およびX²は同一であっても異
なってもよい。mは0または1、nは0または1～6の整数を表す。)

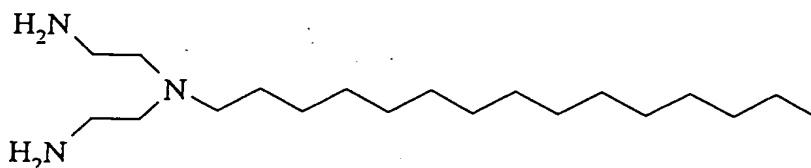
THIS PAGE BLANK (USPTO)



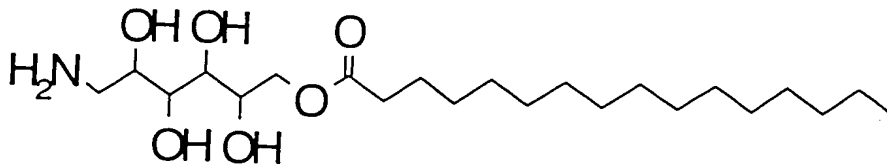
式 2

(式 2 中、 R^3 は水素または炭素数 1～8 のアルキル基もしくはアルニケル基を表す。 R^5 および R^6 は水素または炭素数 1～25 のアルキル基もしくはアルニケル基を表し (但し、 R^5 および R^6 が共に水素である場合を除く。)、 R^5 および R^6 は同一であっても異なってもよい。 X^3 は $-\text{O}-$ または $-\text{S}-$ を表す。 p は 0 または 1、 q は 0 または 1～10 の整数を表す。)

10



式 3

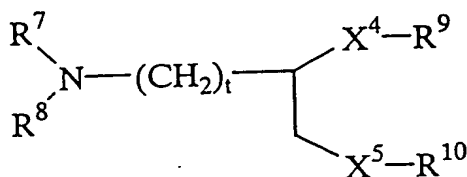


式 4

15 5. (補正後) 前記塩基性化合物が、4級アミン又は3級アミンを有する塩基性化合物である請求項 1、2、4 のいずれかに記載のリポソーム。

6. (補正後) 前記塩基性化合物が、下記式 5 から 6 のグループから選ばれる請求項 1、2、4、5 のいずれかに記載のリポソーム。

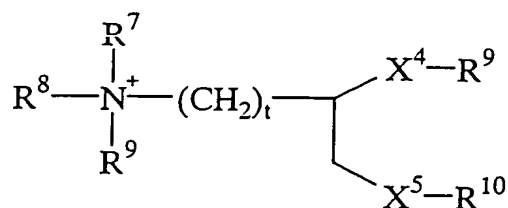
20



式 5

THIS PAGE BLANK (00719)

(式5中、 R^7 および R^8 は炭素数1～8のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^7 および R^8 は同一であっても異なってもよい。 X^4 および X^5 は—O—または—OCO—を表し、 X^4 および X^5 は同一であっても異なってもよい。 R^9 および R^{10} は炭素数10～20のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^9 および R^{10} は同一であっても異なってもよい。 t は1～6の整数を表す。)



式6

10

(式6中、 R^7 , R^8 および R^9 は、炭素数1～8のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^7 、 R^8 および R^9 は同一であっても異なってもよい。 X^4 および X^5 は—O—または—OCO—を表し、 X^4 および X^5 は同一であっても異なってもよい。 R^9 および R^{10} は炭素数10～20のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^9 および R^{10} は同一であっても異なってもよい。 t は1～6の整数を表す。)

7. (補正後) 前記リン酸モノエステル誘導体が、リン酸プレドニゾロン、リン酸リボフラビン、ホスファチジン酸から選ばれる請求項1、2、4、5、6のいずれかに記載のリポソーム。

20 8. (補正後) 前記カルボキシル基またはその塩を有する化合物が、脂肪酸である請求項1、2、4、5、6、7のいずれかに記載のリポソーム。

9. (補正後) 前記脂肪酸が、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン

THIS PAGE BLANK (USPTO)

酸、ミリスチン酸である請求項1、2、4、5、6、7、8のいずれかに記載のリポソーム。

10. (補正後) 前記①②以外のリポソーム膜構成成分が、リン脂質あるいはその誘導体、および／またはステロールあるいはその誘導体である請求
5 項1、2、4、5、6、7、8、9のいずれかに記載のリポソーム。

11. (補正後) 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、抗癌剤、
抗生物質、酵素剤、酵素阻害剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、
抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、
アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻
10 害剤、抗凝固剤、ケミカルメディエーターの遊離抑制剤、血管内皮細胞の増殖ま
たは抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、
リポキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード
反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、NOS阻害剤、AGEs阻害剤あるいは
ラジカルスカベンジャーである請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10の
15 いずれかに記載のリポソーム。

12. (補正後) 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、核
酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体である請求項1、2、4、5、
6、7、8、9、10のいずれかに記載のリポソーム。

13. (補正後) 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、グリコサ
20 ミノグリカンおよびその誘導体である請求項1、2、4、5、6、7、8、9、
10のいずれかに記載のリポソーム。

14. (補正後) 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、オリゴお

THIS PAGE BLANK (USPTO)

よび／または多糖、およびそれらの誘導体である請求項 1、2、4、5、
6、7、8、9、10 のいずれかに記載のリポソーム。

15. (補正後) 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、タンパク
質またはペプチドである請求項 1、2、4、5、6、7、8、9、10 のいずれ
5 かに記載のリポソーム。

16. (補正後) 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、X線造影
剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬等の各種体内診
断薬である請求項 1、2、4、5、6、7、8、9、10 のいずれかに記載
のリポソーム。

10 17. (削除)

18. (削除)

19. (削除)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PCT115	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04182	国際出願日 (日.月.年) 26.06.00	優先日 (日.月.年) 25.06.99
出願人(氏名又は名称) テルモ株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17-19 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 17-19 は手術又は治療による人体の手術又は治療による処置方法及び診断方法であり、国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K9/127, A61K47/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K9/127, A61K47/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP, 9-263579, A (テルモ株式会社) 7. 10月. 1997 (07. 10. 97), 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5, 7, 10-16 3, 6, 8, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 09. 00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保

4P

2939

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 10-120595, A (テルモ株式会社) 12. 5月. 1998 (12. 05. 98), 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 5, 7, 10-16
A		3, 4, 6, 8, 9
A	J P, 7-145038, A (テルモ株式会社) 6. 6月. 1995 (06. 06. 95), 全文 (ファミリーなし)	1-16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3T
Translation
10/018 930RECEIVED
MAR 28 2002
TECH CENTER 1600/2909

Applicant's or agent's file reference PCT115	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/410)	
International application No. PCT/JP00/04182	International filing date (day/month/year) 26 June 2000 (26.06.00)	Priority date (day/month/year) 25 June 1999 (25.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 9/127, 47/18		
Applicant TERUMO KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 7 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 January 2001 (22.01.01)	Date of completion of this report 17 July 2001 (17.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04182

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-3,5-11,13-34, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages 4,12, filed with the letter of 16 April 2001 (16.04.2001)
- ☒ the claims:
pages 2, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1,4-16, filed with the letter of 16 April 2001 (16.04.2001)
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 3,17-19
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04182

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1,2,4-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1,2,4-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1,2,4-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: JP, 9-263579, A

Document 2: 10-120595, A

None of the documents cited in the international search report describes or suggests the inventions set forth in Claims 1, 2, and 4-16, and therefore these inventions appear to be novel and appear to involve an inventive step. Documents 1 and 2 state that a basic compound, phosphatidic acid and other membrane constituent lipids can be used as membrane constituents, and they describe targeting to a desired site, but they neither describe nor suggest the molar ratio of acidic compounds, the compounds of Formulas 5 and 6, or the fact that fatty acids are included.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月4日 (04.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/00174 A1

(51) 国際特許分類: A61K 9/127, 47/18

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04182

(22) 国際出願日: 2000年6月26日 (26.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/180158 1999年6月25日 (25.06.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): テルモ株式会社 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 近藤真代

(KONDO, Masayo) [JP/JP]. 張替貴志 (HARIGAE, Takashi) [JP/JP]. 木村順治 (KIMURA, Junji) [JP/JP]. 磯崎正史 (ISOZAKI, Masashi) [JP/JP]; 〒259-0151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: LIPOSOMES

(54) 発明の名称: リポソーム

(57) Abstract: Drug carriers having a drug encapsulated therein and showing a very high targeting effect of delivering the drug to a target site with a lowered pH in the acidic region value (inflammation, tumor, etc.). These drug carriers are in the form of liposomes comprising (1) a basic compound; (2) an acidic compound which is a monophosphate derivative or a compound having carboxyl or its salt; and (3) other liposome constituent(s).

(57) 要約:

薬物を封入し、酸性領域下で炎症部位や腫瘍部位などのpHが低下した標的部位へのターゲティング性が非常に高い薬物運搬体を得る。

構成成分が、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物、および③他のリポソーム構成成分からなるリポソームにより達成される。

WO 01/00174 A1

明 細 書

リポソーム

5 技術分野

本発明は、薬物を内包するリポソームに関するものである。

背景技術

近年、薬物、DNA、ペプチドおよびタンパク質を目的の部位、例えば癌、肺炎、肝炎、腎炎、リンパ腫、血管内皮損傷部位などの病巣部位に確実に、効率良くかつ安全に薬物のターゲッティングが行えるドラッグデリバリーシステム（DDS）の研究が盛んになってきている。

例えば、リポソーム、エマルジョン、リピッドマイクロスフェア、ナノパーティクルなどの閉鎖小胞を薬物運搬体として利用する方法、高分子合成ポリマーミセルや多糖体等の高分子運搬体に薬物を包含または結合させる方法、これら閉鎖小胞や高分子運搬体に抗体、蛋白質等の高分子機能性分子や、特定の糖鎖、ペプチド等の低分子機能性分子で表面を修飾して標的指向性を高める方法などが挙げられる。しかしながら、これら薬物運搬体の実用化に際しては、克服すべき様々な問題点があり、中でも生体側の異物認識機構からの回避や、体内動態の制御の困難さが問題となっている。特に閉鎖小胞は、血液中のオプソニン蛋白質や血しょう蛋白質との相互作用による凝集や、肝臓、脾臓等の細網内皮系組織（RES）での捕捉のため、標的とする組織や細胞への選択性の高い送達が困

難な状況であった。

- この問題点を解決する手段として、これら閉鎖小胞をはじめとする高分子運搬体の表面をポリエチレングリコール（PEG）等の親水性高分子で被覆することにより、血しょう蛋白やオプソニン蛋白質などの吸着を防止して血中安定性を高め、RESでの捕捉を回避することが可能となってきた。リポソームのような閉鎖小胞は、高い血中滞留性を得られることにより、腫瘍組織や炎症部位などの血管透過性が亢進した組織に受動的に集積させられるようになり、効率よく治療できるようになった。一方、上記の修飾に基づいた閉鎖小胞が、RESを回避する性質を得た場合、リポソームと標的組織との相互作用が低下する。これにより、
- 10 閉鎖小胞の標的組織への送達が向上する反面、標的組織における細胞による閉鎖小胞の取り込みの効率が低下し、その結果該閉鎖小胞に封入された薬物の細胞への送達の効率が低下したり、血液中の蛋白などの生体成分との相互作用により引き起こされるリポソームの崩壊が抑制されその結果該閉鎖小胞に封入された薬物の放出速度が低下するなどの弊害がある。
- 15 これまでに多くの塩基性化合物を膜成分として含有するリポソームが遺伝子を細胞内へ運搬するためのツールとして研究されている。各種の塩基性化合物を膜に含むリポソームは陰性荷電を持つ物質との親和性を持つが、特に細胞表面には、ヘパラン硫酸などの硫酸化多糖類の様な陰性電荷の物質により構成されるため、塩基性化合物を含有するリポソームは細胞膜との親和性が強いことが期待
- 20 される。しかし、このような塩基性化合物を含有するリポソームは、血液中に投与されると、血清中のタンパク質や赤血球膜表面などの陰性荷電の物質と結合してしまうため、その表面電荷が変化してしまうか、あるいは、血中で凝集を

起こしてしまい、細胞膜との親和性能が失われてしまうことが問題とされていた。従って、血流中ではタンパク質や細胞との相互作用がなく安定に循環するが、病巣部位においてのみ細胞との相互作用が強まり、薬物を細胞へ送達できるようなドラッグデリバリーシステムが望まれる。

- 5 これら問題を解決するため、各種の環境応答性薬物運搬体、すなわち疾病に起因する環境変化、または、正常組織と病巣部位の環境の相違に応答して性質が変化する薬物運搬体が検討されている。例えば、腫瘍や炎症などの病巣部位では局所の pH が正常な組織よりも低下することが知られており (V. Menkin, Biochemical Mechanism in Inflammation, Thomas, 10 Springfield, Ill, pp. 69-7 (1956))、このような病変部位での pH 変化による環境に応答して薬物を放出したり、ターゲティングすることを目的とした検討が試みられている (Biochim Biophys Acta, 1329 (2), 291-301 (1997)、FEBS, 421 (1), 61-4 (1998))。しかしながら、pH の変化に応答し、その標的指向性が向上するリポソームの報告はされていない。

15

発明の開示

- 本発明は、従来の標的指向性リポソームの欠点を克服し、任意の環境変化に応答する標的指向性リポソームを提供するためになされたものである。すなわち、本発明の目的は、薬物、DNA、ペプチドおよびタンパク質を病巣部位における 20 pH 変化により速やかに標的指向性能を発揮するリポソームを提供することである。

本発明のリポソームは、循環血液中のような生理的 pH 条件では、陰性電荷の

物質との相互作用は弱く、そのため、細胞やタンパク質などとの相互作用は少ないため、血液中でも安定であるが、炎症部位や腫瘍部位などのpHが低下した標的部位では、陰性荷電の物質との相互作用が増強されて、細胞親和性が向上し、標的部位に効率的に集積し、また、標的部位以外では集積が抑えられる結果、副作用の軽減などの効果が期待される。

上記課題は以下の本発明により解決される。

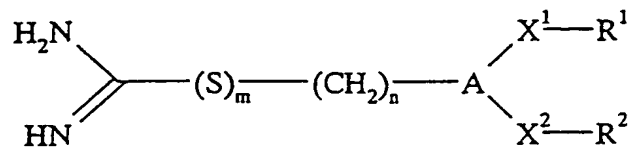
(1) 本発明は、治療および／または診断を目的とする薬物を内包するリポソームであって、膜構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物から選択される酸性化合物、および③、①②以外のリポソーム膜構成成分からなるリポソームである。

(2) 本発明は、治療および／または診断を目的とする薬物を内包するリポソームであって、膜構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物から選択される酸性化合物、および③他のリポソーム膜構成成分からなり、炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位でpHが5～7の環境下において、能率的に集積するリポソームである。

(3) 本発明は、上記(1)に記載のリポソームであって、塩基性化合物のモル比が全リポソーム膜構成成分中1～30mol%であるリポソームである。

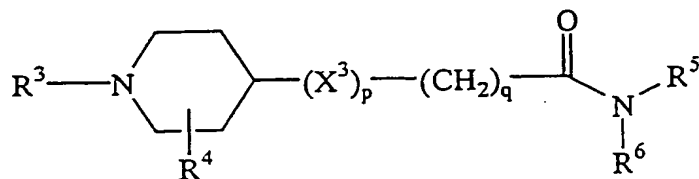
(4) 本発明は、上記(1)に記載のリポソームであって、リン酸モノエステル誘導体またはカルボン酸誘導体である酸性化合物のモル比が全リポソーム膜構成成分中0.5～30mol%であるリポソームである。

(5) 本発明は、前記塩基性化合物が、下記式 1 から 4 のいずれかに示される塩基性化合物である (1) に記載のリポソームである。



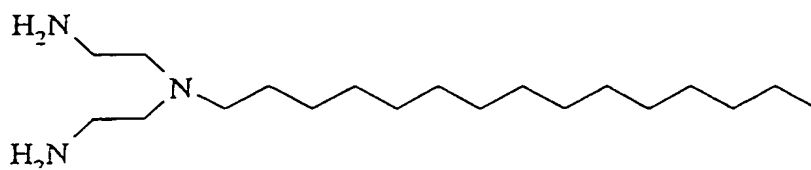
式 1

(式 1 中、A は芳香環を表す。R¹ 及び R² は炭素数 10～25 のアルキル基またはアルニケル基を表し、R¹ および R² は同一であっても異なってもよい。X¹ および X² は -O-、-S-、-COO-、-OCO-、-CONH- または NHCO- を表し、X¹ および X² は同一であっても異なってもよい。m は 0 または 1、n は 0 または 1～6 の整数を表す。)

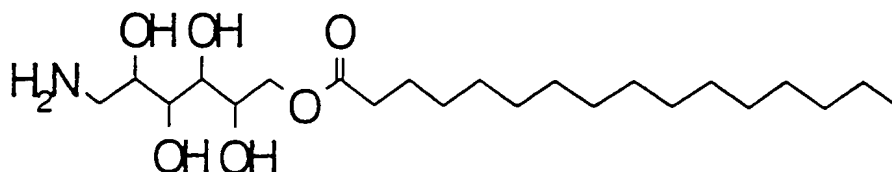


式 2

(式 2 中、R³ は水素または炭素数 1～8 のアルキル基もしくはアルニケル基を表す。R⁵ および R⁶ は水素または炭素数 1～25 のアルキル基もしくはアルニケル基を表し (但し、R⁵ および R⁶ が共に水素である場合を除く。)、R⁵ および R⁶ は同一であっても異なってもよい。X³ は -O- または -S- を表す。p は 0 または 1、q は 0 または 1～10 の整数を表す。)



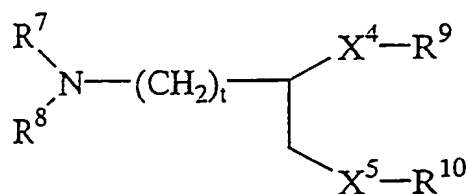
式 3



式 4

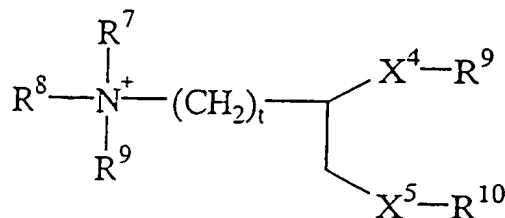
(6) 本発明は、前記塩基性化合物が、4級アミン又は3級アミンを有する塩基性化合物である上記(1)に記載のリポソームである。

(7) 本発明は、前記塩基性化合物が、下記式5から6のグループから選ばれる上記(1)に記載のリポソームである。



式 5

(式5中、R⁷ およびR⁸ は炭素数1～8のアルキル基またはアルケニル基を表し、R⁷ およびR⁸ は同一であっても異なってもよい。X⁴ およびX⁵ は—O—または—O C O—を表し、X⁴ およびX⁵ は同一であっても異なってもよい。R⁹ およびR¹⁰は炭素数10～20のアルキル基またはアルケニル基を表し、R⁹ およびR¹⁰は同一であっても異なってもよい。tは1～6の整数を表す。)



式 6

(式6中、R⁷ , R⁸ およびR⁹ は、炭素数1～8のアルキル基またはアルケニル基を表し、R⁷ , R⁸ およびR⁹ は同一であっても異なってもよい。

X^4 および X^5 は $-O-$ または $-OCO-$ を表し、 X^4 および X^5 は同一であっても異なってもよい。 R^9 および R^{10} は炭素数 10～20 のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^9 および R^{10} は同一であっても異なってもよい。 t は 1～6 の整数を表す。)

- 5 (8) 本発明は、前記リン酸モノエステル誘導体が、リン酸プレドニゾロン、リン酸リボフラビン、ホスファチジン酸から選ばれる上記 (1) に記載のリポソームである。

(9) 本発明は、前記カルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物が、脂肪酸である上記 (1) に記載のリポソームである。

- 10 (10) 本発明は、前記脂肪酸が、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸である上記 (9) に記載のリポソームである。

(11) 本発明は、前記他のリポソーム膜構成成分が、リン脂質あるいはその誘導体、および／またはステロールまたはその誘導体である上記 (1) に記載のリポソームである。

- 15 (12) 本発明は、前記治療および／または診断を目的とする薬物が、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、酵素阻害剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメディエーターの遊離抑制剤、血管内皮細胞
- 20 の増殖または抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、リボキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、NOS阻害剤、AGEs 阻害

剤あるいはラジカルスカベンチャーである上記（１）に記載のリポソームである。

（１３）本発明は、前記治療および／または診断を目的とする薬物が、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体である上記（１）に記載の
5 リポソームである。

（１４）本発明は、前記治療および／または診断を目的とする薬物が、グリコサミノグリカンおよびその誘導体である上記（１）に記載のリポソームである。

（１５）本発明は、前記治療および／または診断を目的とする薬物が、オリゴ
10 および／または多糖、およびそれらの誘導体である上記（１）に記載のリポソームである。

（１６）本発明は、前記治療および／または診断を目的とする薬物が、タンパク質またはペプチドである上記（１）に記載のリポソームである。

（１７）本発明は、前記治療および／または診断を目的とする薬物が、X線造
15 影剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬等の各種体内診断薬である上記（１）に記載のリポソームである。

（１８）治療および／または診断を目的とする薬物を内包するリポソーム基質に、pH 6.5とpH 7.4のリン酸緩衝液中におけるリポソームへのコンドロイチン硫酸Cの吸着量比が、pH 6.5における吸着量／pH 7.4における
20 吸着量 \geq 1.5となるように①塩基性化合物と②リン酸モノエステル誘導体またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物とを添加して、リポソームの病巣部位への集積率を高める方法。

本発明のリポソームには、表面修飾剤として親水性高分子の脂質誘導体を必要に
5 応じ加えることができ、その分子量は、1000～7000が望ましい。前記親水性高分子の脂質誘導体としては、ポリエチレングリコール誘導体が望ましく、特にポリエチレングリコール鎖とジアシルグリセロールを一分子内に含む化合物が望ましい。

(19) リポソーム膜構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物、
10 および③、①②以外のリポソーム膜構成成分を含有し、治療および/または診断を目的とする薬物を内包するリポソームを、人を含む動物に投与して、pHが5～7の病巣部位に集積させる治療および/または診断方法。

(20) リポソーム膜構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物、
15 および③、①②以外のリポソーム膜構成成分を含有し、治療および/または診断を目的とする薬物を内包するリポソームを、治療および/または診断を目的とする薬物をpHが5～7の病巣部位に集積させるために使用する方法。

図面の簡単な説明

図1は、各リポソームとプロテオグリカン（コンドロイチン硫酸C）との親和性を表したグラフである。

20 図2は、各リポソームとプロテオグリカン（コンドロイチン硫酸C）との親和性を表したグラフである。

図3は、各リポソームとプロテオグリカン（コンドロイチン硫酸C）との

親和性を表したグラフである。

図4は、各リポソームとヒト大動脈平滑筋初代細胞との親和性を表したグラフである。

5 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施の形態について説明する。本発明のリポソームの構成成分は、それ単独で、膜に埋め込まれたときに、生理的pH付近から酸性条件下では膜に正電荷を与える塩基性化合物と、それ単独で膜に埋め込まれたときに生理的pHでは陰電荷を持つが、生理的pH付近から酸性側ではイオン化が抑制されて

- 10 陰電荷が減少するような酸性化合物と、その他のリポソーム構成成分からなり、小球状の構造を形成し、かつ安全性があれば特に限定せず使用することができる。

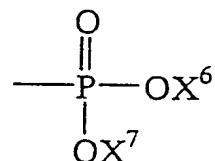
- ここで、生理的pH条件とは、生体内のpH、すなわち7.4前後、概ね7.2から7.6の範囲である。生理的pH付近より酸性側とは、pH7.4付近より酸性側、概ねpH6～8の範囲で酸性側を指す。この領域から解離が抑制される酸性化合物であれば塩基性化合物との組み合わせにより性能を発揮することが期待される。しかし、pH4以下のような極端な酸性領域でのみ解離が抑制される化合物、例えばリン酸ジエステル誘導体などはこのような作用を持たないため、本発明の酸性化合物には含まれないことは後述する実施例により明らかに
- 15 20 される。

具体的な本発明のリポソームの膜構成成分として、上記式1から6のいずれかに示される塩基性化合物、およびリン酸モノエステル誘導体またはカルボキシル

基またはその塩を有する化合物である酸性化合物、およびその他のリポソーム膜構成成分があげられ、小球状の構造を形成し、かつ安全性があるものであれば特に限定せず使用することができる。

上記式 1 から 4 のいずれかに示される塩基性化合物としては、どれも適選使用できるが、特に、アミジン誘導体、ピペリジン誘導体、1 級アミン誘導体、2 級アミン誘導体、3 級アミン誘導体、4 級アミン誘導体などが望ましい。塩基性化合物の量は、全リポソーム膜構成成分中の 1 ～ 30、さらには、5 ～ 30 mol% であるのが好ましい。この範囲であると、pH が 5 ～ 7 の炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位への集積性が向上する。

リン酸モノエステル誘導体とは、ホスホネート基 (phosphonato) を有する化合物をいい、ホスホネート基とは、



(X^6 、 X^7 は水素またはナトリウム、カリウムなどの医薬上許容されるカチオンを表わし、 X^6 、 X^7 は同一であっても異なってもよい。)

リポソームの構造安定を損なうものでなければ特に限定されない。具体的には、リン酸プレドニゾロンなどのステロイドのリン酸エステル、リン酸リボフラビン、ホスファチジン酸などがあげられる。特に、リン酸モノエステル誘導体の酸性化合物は、pH 酸性領域下で、炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位に特異的に集積するため、本発明のリポソームの構成成分として望ましい。

カルボキシル基またはその塩を有する化合物は、 ---COOX^8 基を有する化合

物であり、 X^{δ} は水素またはナトリウム、カリウムなどの医薬上許容されるカチオンを表わす。脂肪酸としては、リポソームの構造安定を損なうものでなければ特に限定されない。具体的には、天然または合成の、オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸、リノレン酸等があげられる。

- 5 リン酸モノエステル誘導体またはカルボン酸誘導体である酸性化合物の量は、全リポソーム膜構成成分中の 0.5 ~ 30 mol% であるのが好ましい。この範囲であると、pH が 5 ~ 7 の炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位への集積性が向上する。

- 本発明は、リポソーム膜構成成分として①塩基性化合物に加えて②特定の酸性
10 化合物を加えることが特徴であり、従来、脂質として使用されているホスファチジルコリンはリン酸ジエステル化合物ではあるが、1 分子の中に酸性基と塩基性基を有する双性イオン性化合物なので生理的 pH 付近で中性である。

- 前記塩基性化合物および前記酸性化合物を除く、他のリポソーム膜構成成分としては、リン脂質やコレステロール等のステロールがあげられる。リン脂質とし
15 ては、例えばホスファチジルコリン（レシチン）、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、スフィアングミエリン、カルジオリピン等の天然または合成のリン脂質、これらを常法に従って水素添加したものが挙げられる。

- 本発明のリポソーム膜は、さらに安定化剤を含んでもよく、例えば、膜流動性を
20 低下させるコレステロール等のステロール、グリセロール、シュクロース等の糖類が挙げられる。酸化防止剤は、例えば、トコフェロール同族体、即ち、ビタミン E が挙げられる。トコフェロールには α 、 β 、 γ および δ の 4 個が異性

体で存在するが、本発明にはいずれも用いることができる。

リポソーム表面を修飾する親水性高分子の脂質誘導体は、リポソームの構造安定を損なうものでなければ特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、デキストラン、プルラン、フィコール、ポリビニルアルコール、合成ポリアミノ

5 酸、アミロース、アミロペクチン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナン、及びこれらの誘導体が挙げられる。中でもポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコール誘導体が望ましい。

親水性高分子の脂質誘導体の分子量は、1000～7000であるのが好ましい。特に分子量1000～7000のポリエチレングリコールおよびポリエチレ

10 ングリコール誘導体は、血中滞留性を向上させる効果が顕著であり、好ましい。ポリエチレングリコール誘導体は、特に限定されないが、ポリエチレングリコール鎖とジアシルグリセロールを一分子内に有する化合物であるのが望ましい。

リポソーム表面を親水性高分子により修飾するには、様々な方式が挙げられ、

15 特に限定されないが、前記親水性高分子を長鎖脂肪族アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルキル、またはグリセリン脂肪酸エステル、リン脂質等の疎水性化合物と結合させて、前記疎水性化合物の部分をリポソーム表面へ挿入する方式が好ましい。

診断および／または治療のための薬物は、目的に応じて、薬学的に許容し得る

20 薬理的活性物質、生理的活性物質および／または診断用物質を用いることができる。薬物の種類としては、リポソームの形成を損なうものでなければ特に限定されない。

具体的には、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメデイエーターの遊離阻害剤、血管内皮細胞の

5 増殖促進または抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、リポキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、一酸化窒素合成阻害剤、Advanced glycation endproducts阻害剤、ラジカルスカベンチャー、タンパク質、ペプチド、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体などが挙げ

10 られる。

例えば、抗癌剤の例としては、シクロホスファミド、イホスファミド、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、チオテパ、ブルスファン、カルボコン、塩酸ニムスチン、ラニムスチン、メルファラン、トシル酸インプロスルファン、ダカルバジン、塩酸プロカルバジン、シタラビン、シタラビンオク

15 スファート、エノシタビン、メルカプトプリン、チオイノシン、フルオロウラシル、ドキシフルリジン、テガフル、メトトレキサート、カルモフル、ヒドロキシカルバミド、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンデシン、エトポシド、クロモマイシンA₃、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸アラクルビシン、ピラルビシン、塩酸エピルビシン、ダクチノマイシン、塩

20 酸ミトキサントロン、塩酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、マイトマイシンC、ネオカルノスタチン、L-アスパラギナーゼ、アセグラトンミトプロニトール、デキストラン硫酸ナトリウム、酢酸オクトレオチド、シスプラチン、

カルボプラチン、クエン酸タモキシフェン、酢酸メドロキシプロゲステロン、リン酸エストラムスチンナトリウム、酢酸ゴセレリン、酢酸リュープロレリン、塩酸イリノテカンなどが挙げられる。

抗生物質の例としては、ベンジルペニシリンカリウム、ベンジルペニシリンベンザチン、フェノキシメチルペニシリンカリウム、フェネチシリンカリウム、クロキサシリンナトリウム、フルクロキサシリンナトリウム、アンピシリン、トシル酸スルタミシリン、塩酸バカンピシリン、塩酸タランピシリン、レナンプシリン、ヘタシリンカリウム、シクラシリン、アモキシシリン、塩酸ピブメシリナム、アスポキシシリン、カルベニシリンナトリウム、カリンダシリンナトリウム、スルベニシリンナトリウム、チカルシリンナトリウム、ピペラシリンナトリウム、セファロリジン、セファロチンナトリウム、セファゾリンナトリウム、セファピリンナトリウム、セフラジン、セファレキシン、セファトリジンプロピレングリコール、セフロキサジン、セファクロル、セファドロキシル、塩酸セフォチアム、塩酸セフォチアムヘキセチル、セフロキシムナトリウム、セフロキシムアキセチル、セファマンドールナトリウム、セフジニル、塩酸セフェタメトピボキシル、セフチプテン、セフメタゾールナトリウム、セフォキシチンナトリウム、セフォテタンナトリウム、セフミノクスナトリウム、セフペラゾンナトリウム、セフピラミドナトリウム、セフスロジンナトリウム、セフォタキシムナトリウム、セフォペラゾンナトリウム、セフチゾキシムナトリウム、塩酸セフメノキシム、セフトリアキソンナトリウム、セフトラジウム、セフピミゾールナトリウム、セフィキシム、セフテラムピボキシル、セフゾナムナトリウム、セフボキシプロキセチル、セフォジウム、硫酸セフピロム、ラタモキセフナト

- リウム、フロモキシセフナトリウム、イミペネム、シラスタチンナトリウム、アズ
トレオナム、カルモナムナトリウム、硫酸ステレプトマイシン、硫酸カナマ
イシン、硫酸フラジオマイシン、硫酸アミカシン、硫酸ゲンタマイシン、硫酸パ
ロモマイシン、硫酸ペカナマイシン、硫酸リポスタマイシン、硫酸ジベカシン、
5 トブラマイシン、硫酸シソマイシン、硫酸ミスロノマイシン、硫酸アストロマイ
シン、硫酸ネチルマイシン、硫酸イセパマイシン、硫酸アルベカシン、エリスロ
マイシン、キタサマイシン、アセチルキタサマイシン、リン酸オレアンドマ
イシン、ジョサマイシン、アセチルスピラマイシン、ミデカマイシン、酢酸ミデ
カマイシン、ロキタマイシン、ロキシスロマイシン、クラリスロマイシン、塩酸
10 テトラサイクリン、塩酸オキシテトラサイクリン、メタリン酸テトラサイク
リン、塩酸デメチルクロルテトラサイクリン、ロリテトラサイクリン、塩酸ドキ
シサイクリン、塩酸ミノサイクリン、クロラムフェニコール、コハク酸クロラム
フェニコールナトリウム、パルミチン酸クロラムフェニコール、チアンフェ
ニコール、塩酸アミノ酢酸チアンフェニコール、硫酸コリスチン、コリスチンメ
15 タンスルホン酸ナトリウム、硫酸ポリミキシシンB、バシトラシン、塩酸バンコマ
イシン、塩酸リンコマイシン、クリンダマイシン、塩酸スペクチノマイシン、ホ
スホマイシンナトリウム、ホスホマイシンカルシウムなどが挙げられる。

- 酵素剤の例としては、キモトリプシン、結晶トリプシン、ストレプトキ
ナーゼ・ストレプトドルナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ウロキナーゼ、ナサル
20 プラーゼ、アルテプラーゼ、塩化リゾチーム、セミアルカリプロティナーゼ、セ
ラペプターゼ、チソキナーゼ、デュテプラーゼ、バトロキシピン、プロナーゼ、
プロメラインなどが挙げられる。

抗酸化剤の例としては、トコフェロール、アスコルビン酸、尿酸などが挙げられる。

- 抗炎症剤の例としては、サリチル酸コリン、サザピリン、サリチル酸ナトリウム、アスピリン、ジフルニサル、フルフェナム酸、メフェナム酸、フロクタフェニン、トルフェナム酸、ジクロフェナクナトリウム、トルメチンナトリウム、スリンダク、フェンブフェン、フェルビナクエチル、インドメタシン、インドメタシンファルネシル、アセメタシン、マレイン酸プログルメタシン、アンフェナクナトリウム、ナブメトン、イブプロフェン、フルルビプロフェン、フルルビプロフェンアキセチル、ケトプロフェン、ナプロキセン、プロチジン酸、プラノプロフェン、フェノプロフェンカルシウム、チアプロフェン酸、オキサプロジン、ロキソプロフェンナトリウム、アルミノプロフェン、ザルトプロフェン、フェニルブタゾン、クロフェゾン、ケトフェニルブタゾン、ピロキシカム、テノキシカム、アンピロキシカム、塩酸チアラミド、塩酸チノリジン、塩酸ベンジダミン、エピリゾール、エルモファゾンなどが挙げられる。
- ステロイド剤の例としては酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン（リン酸エステル、酢酸塩）、酪酸ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、プレドニゾン（アセテート、サクシネート、第三級ブチル酢酸エステル、リン酸エステル）、メチルプレドニゾン（アセテート）、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド（酢酸トリアムシノロン）、デキサメタゾン（リン酸エステル、酢酸塩、リン酸ナトリウム塩、硫酸エステル）、パルミチン酸デキサメタゾン、ベタメタゾン（リン酸塩、2ナトリウム塩）、酢酸パラメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、酢酸ハロプレ

ドン、プロピオン酸クロベタゾール、ハルシノニド、プロピオン酸ベクロ
メタゾン、吉草酸ベタメタゾン、酢酸ベタメタゾン、酢酸コルチゾンなどが挙げ
られる。

アンジオテンシン変換酵素阻害剤の例としては、アラセプリル、塩酸イミダプ
5 リル、塩酸テモカプリル、塩酸デラプリル、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、
シラザプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリルなどが挙げられる。

血管拡張剤の例としては、テオフィリン、ジプロフィリン、プロキシフィ
リン、アミノフィリン、コリンテオフィリン、プロスタグランジン、プロスタグ
ランジン誘導体、アルプロスタジルアルファデクス、アルプロスタジル、リマプ
10 ロストアルファデクス、パパベリン、シ克蘭デラート、シンナリジン、フマル
酸ベンシ克蘭、マレイン酸シネパジド、塩酸ジラゼブ、トラピジル、塩酸
ジフェニドール、ニコチン酸、イノシトールヘキサニコチネート、クエン酸ニカ
メタート、酒石酸ニコチニックアルコール、ニコチン酸トコフェロール、ヘプロ
ニカート、塩酸イソクスプリン、硫酸バメタン、塩酸トラリゾン、メシル酸ジヒ
15 ドロエルゴトキシシン、酒石酸イフェンプロジル、塩酸モキシシリト、ニセル
ゴリン、塩酸ニカルジピン、ニルバジピン、ニフェジピン、塩酸ベニジピン、塩
酸ジルチアゼム、ニソルジピン、ニトレンジピン、塩酸マニジピン、塩酸バルニ
ジピン、塩酸エホニジピン、塩酸ベラパミル、塩酸トリメタジジン、カプトプリ
ル、マレイン酸エナラプリル、アラセプリル、塩酸デラプリル、シラザプリル、
20 リシノプリル、塩酸ベナゼプリル、塩酸ヒドララジン、塩酸トドララジン、
ブドララジン、カドララジン、インダパミド、塩酸カルボクロメン、エフロ
キサート、塩酸エタフェノン塩酸オキシフェドリン、ニコランジル、亜硝酸アミ

ル、硝酸イソソルビドなどが挙げられる。

平滑筋細胞遊走・増殖抑制剤の例としては、ヘパリンナトリウム、ダルテパリンナトリウム（低分子ヘパリン）、ヘパリンカルシウム、デキストラン硫酸などが挙げられる。

- 5 血小板凝集阻害剤の例としては、塩酸チクロピジン、シロスタゾール、イコサペント酸エチル、ベラプロストナトリウム、塩酸サルプグレラート、バトロキシビン、ジピリダモールなどが挙げられる。

抗凝固剤の例としては、ヘパリンナトリウム、ダルテパリンナトリウム（低分子ヘパリン）、ヘパリンカルシウム、デキストラン硫酸、ワルファリンカ

- 10 リウム、アルガトロバンなどが挙げられる。

ケミカルメディエーター遊離抑制剤の例としては、トラニラスト、フマル酸ケトフェチン、塩酸アゼラスチン、オキサトミド、アンレキサノクス、レピリナストなどが挙げられる。

免疫抑制剤の例としては、シクロスポリンなどが挙げられる。

- 15 抗ウイルス剤の例としては、アシクロビル、ガンシクロビル、ジダノシン、ジドブジン、ソリブジン、ビダラビンなどが挙げられる。

また、封入する診断するための薬剤の種類としては、薬物担体の形成を損ねない限り特に限定されるものではない。具体的には、X線造影剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬等が挙げられる。

- 20 例えば、X線造影剤の例としては、アミドトリゾ酸メグルミン、イオタラム酸ナトリウム、イオタラム酸メグルミン、ガストログラフィン、ヨーダミドメグルミン、リピオドールウルトラフルイド、アジピオドンメグルミン、イオキサグル

酸、イオトロクス酸メグルミン、イオトロラン、イオパノ酸、イオパミドール、イオヘキソール、イオベルソール、イオポダートナトリウム、イオメプロール、イソペーク、ヨードキサム酸などが挙げられる。

- 本発明のリポソームは、常法によって容易に得ることができる。その一例を以
- 5 下に示す。塩基性化合物、酸性化合物、およびその他のリン脂質、安定化剤、酸化防止剤等の構成成分を、フラスコ内のクロロホルム等の有機溶媒中で混合し、有機溶媒を留去した後、真空乾燥することによりフラスコ内壁に薄膜を形成させる。次に前記フラスコ内に薬物を加え、激しくかくはんすることにより、リポソーム分散液を得る。得られたリポソーム分散液を遠心分離し、上製を
- 10 デカンテーションして封入されなかった薬物を除去する。必要に応じ、更に、親水性高分子の脂質誘導体の溶液を加えて加温することにより、本発明のリポソームが得られる。

- なお、親水性高分子の脂質誘導体の溶液を構成成分の混合時に加えることによっても、本発明のリポソームが得られる。親水性高分子の脂質誘導体の溶液
- 15 を添加する方法は、いずれのときでも特に問題はないが、構成成分の混合時に添加する方法ではリポソーム内部にも親水性高分子の脂質誘導体が入ることとなり、実質的な表面修飾率の低下と内封容積の低下を招く場合がある。

また、別の方法として、上記の構成成分を混合し、高圧吐出型乳化機により高圧吐出させることにより本発明のリポソームを得ることもできる。

- 20 本発明のリポソームの投与方法としては、特に限定せず、溶液として静脈投与することなどで行われる。本発明のリポソームは、生体内に投与すると炎症部位や腫瘍部位などのpH酸性の領域に特異的に集積し、他の領域では集積が抑えら

れることから、抗炎症剤や抗腫瘍剤などの運搬体として適しており、これらの薬剤の効力を効果的に発揮させ、かつ副作用を軽減するなどの効果がある。

以下、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

5 (実施例1)

3, 5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩（塩基性化合物）およびミリスチン酸（脂肪酸）を構成成分とするリポソームの調製

(1-①) まず、ホスファチジルコリン 4.62 mmol、コレステロール 4.62 mmol、3, 5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩 10 0.76 mmolをt-ブチルアルコール100 mlに溶解させた脂質混合溶液を氷浴で凍結し、一晚凍結乾燥を行い脂質混合物を得た。

(1-②) (1-①)の手法により得られた脂質混合物0.06 mmolを容量50 mlのナス型フラスコにはかり取り、1.14 mMのミリスチン酸／クロロホルム溶液を2 ml加えた。クロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することにより 15 フラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

これに生理食塩水6 mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。これを孔径0.4 μ mのポリカーボネートフィルムを用いて圧送し、ついで0.2 μ m、0.1 μ mのポリカーボネートフィルムを用いて圧送することによって整粒を行い、平均粒子径が90～200 nmの標記のリポ 20 ソーム分散液を得た。本発明①の塩基性化合物が7.3 mol%、本発明②の酸性化合物が3.7 mol%である標記のリポソーム分散液を得た。得られたリポソームの平均粒子径は125.5 nmであった。

(実施例2)

3, 5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩およびホスファチジン酸（リン酸モノエステル誘導体）を構成成分とするリポソームの調製

上記（1-①）の手法により得られた脂質混合物0.06mmolを容量50mlのナス型フラスコにはかり取り、1.14mMのホスファチジン酸／クロロホルム溶液を0.5ml加えた。クロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりしフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。これに生理食塩水6mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記（1-②）と同様の方法により、平均粒子径が90～200nmで本発明①の塩基性化合物が7.5mol%、本発明②の酸性化合物が0.9mol%である標記のリポソーム分散液を得た。得られたリポソームの平均粒子径は130.7nmであった。

(実施例3)

3, 5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩（塩基性化合物）およびリン酸プレドニゾロンナトリウム（リン酸モノエステル誘導体）を構成成分とするリポソームの調製

上記（1-①）の手法により得られた脂質混合物0.6mmolに75mMリン酸プレドニゾロンナトリウム水溶液10mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。これを孔径0.4μmのポリカーボネートフィルムを用いて圧送し、ついで0.2μm、0.1μmのポリカーボネートフィルムを用いて圧送することによって整粒を行った。得られたリポソーム分散液をカラム（Sephacrose 4 Φ3cm X20cm、溶離液：生理食塩水）にかけて

リポソーム画分を回収し、粒子径が90～200nm（平均粒子径130.7nm）の標記のリポソーム分散液を得た。

（実施例4）

3, 5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩（塩基性化合物）および
5 ビリン酸リボフラビンナトリウム（リン酸モノエステル誘導体）を構成成分とするリポソームの調製

上記（1-①）の手法により得られた脂質混合物0.6mmolに75mMリン酸リボフラビンナトリウム水溶液10mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、実施例3と同様に操作し、標記の
10 リポソーム分散液を得た。得られたリポソームの平均粒子径は117.9nmであった。

（実施例5）

1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（塩基性化合物）およびミリスチン酸（脂肪酸）を構成成分とするリポソームの調製
15 ホスファチジルコリン25μmol、コレステロール25μmol、1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン25μmol、ミリスチン酸25μmolを10mlのクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。
20 これに生理食塩水5mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記（1-②）と同様の方法により、平均粒子径が90～200nmでリポソーム分散液を得た。0.4mMポリエチレング

リコラーホスファチジルエタノールアミン誘導体生食溶液とリポソーム分散液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、本発明①の塩基性化合物が25mol%、本発明②の酸性化合物が25mol%、ポリエチレングリコラーホスファチジルエタノールアミン誘導体2mol%である標記のリポソーム分散液を得た。

(実施例6)

1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（塩基性化合物）およびミリスチン酸（脂肪酸）を構成成分とするリポソームの調製

ホスファチジルコリン20 μmol 、コレステロール20 μmol 、1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン30 μmol 、ミリスチン酸30 μmol を10mlのクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

これに生理食塩水5mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記（1-②）と同様の方法により、平均粒子径が90～200nmでリポソーム分散液を得た。0.4mMポリエチレングリコラーホスファチジルエタノールアミン誘導体生食溶液とリポソーム分散液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、本発明①の塩基性化合物が30mol%、本発明②の酸性化合物が30mol%、ポリエチレングリコラーホスファチジルエタノールアミン誘導体2mol%である標記のリポソーム分散液を得た。

なお、ホスファチジルコリン10 μmol 、コレステロール10 μmol 、

1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン 40 μmol 、ミリスチン酸 40 μmol で同様に調製を試みたが、リポソーム分散液を得ることはできなかった。

(実施例 7)

- 5 1, 2-ジパルミトイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン（塩基性化合物）およびパルミチン酸（脂肪酸）を構成成分とするリポソームの調製

ホスファチジルコリン 35 μmol 、コレステロール 35 μmol 、1, 2-ジパルミトイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン 20 μmol 、パルミチン酸 10 μmol を 10 ml のクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターで
10 クロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

これに生理食塩水 5 ml を加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記（1-②）と同様の方法により、平均粒子径が90～200 nmでリポソーム分散液を得た。0.4 mM ポリエチレングリコール-
15 リコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体生食溶液とリポソーム分散液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、本発明①の塩基性化合物が20 mol%、本発明②の酸性化合物が10 mol%、ポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体2 mol%である標記のリポソーム分散液を得た。

20 (実施例 8)

1, 2-ジパルミトイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン（塩基性化合物）およびパルミチン酸（脂肪酸）を構成成分とするリポソームの調製

ホスファチジルコリン $30\ \mu\text{mol}$ 、コレステロール $30\ \mu\text{mol}$ 、1, 2-ジパ
ルミトイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン $20\ \mu\text{mol}$ 、パルミチン酸
 $20\ \mu\text{mol}$ を $10\ \text{ml}$ のクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロ
ロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を
5 形成した。

これに生理食塩水 $5\ \text{ml}$ を加え、 55°C で5分間超音波処理することによ
り、リポソーム分散液を得た。以下、上記(1-②)と同様の方法により、平均
粒子径が $90\sim 200\ \text{nm}$ でリポソーム分散液を得た。 $0.4\ \text{mM}$ ポリエチレング
リコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体生食溶液とリポソーム分散液
10 を等容量加えた後 60°C で30分加温することによって、本発明①の塩基性化
合物が $20\ \text{mol}\%$ 、本発明②の酸性化合物が $20\ \text{mol}\%$ 、ポリエチレングリコール-
ホスファチジルエタノールアミン誘導体 $2\ \text{mol}\%$ である標記のリポソーム分散液を
得た。

(実施例9)

15 3, 5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩(塩基性化合物)およびホ
スファチジン酸を構成成分とするリポソームの調製

ホスファチジルコリン $44\ \mu\text{mol}$ 、コレステロール $44\ \mu\text{mol}$ 、3, 5-ジペ
ンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩 $10\ \mu\text{mol}$ 、ホスファチジン酸 $2\ \mu\text{mol}$ を
 $10\ \text{ml}$ のクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロロホルムを除
20 去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

これに生理食塩水 $5\ \text{ml}$ を加え、 55°C で5分間超音波処理することによ
り、リポソーム分散液を得た。以下、上記(1-②)と同様の方法により、平均

粒子径が90～200nmでリボソーム分散液を得た。0.12mMポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体生食溶液とリボソーム分散液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、本発明①の塩基性化合物が10mol%、本発明②の酸性化合物が2mol%、ポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体0.6mol%である標記のリボソーム分散液を得た。

(比較例1)

上記(1-①)の手法により得られた脂質混合物0.6mmolに生理食塩水10mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リボソーム分散液を得た。これを、上記(1-②)と同様の方法により平均粒子径が90～200nmの標記のリボソーム分散液を得た。得られたリボソームの平均粒子径は110.5nmであった。

(比較例2)

3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩およびホスファチジルグリセロールを構成成分とするリボソームの調製

上記(1-①)の手法により得られた脂質混合物0.06mmolを容量50mlのナス型フラスコにはかり取り、1.14mMのホスファチジルグリセロール/クロロホルム溶液を2ml加えた。クロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。これに生理食塩水6mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リボソーム分散液を得た。上記(1-②)と同様の方法により、平均粒子径が90～200nmである標記のリボソーム分散液を得た。得られたリボソームの平均粒子径は138.8nmで

あった。

(比較例3)

3, 5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩およびポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体を構成成分とするリポソーム

5 の調製

比較例1により得られたリポソーム分散液の脂質濃度を20mMに調整した。このリポソーム分散液にポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体溶液(分子量約6000、濃度1.214mg/ml)を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、粒子径が90~200nm(平均粒子径
10 117.4nm)である標記のリポソーム分散液を得た。

(比較例4)

1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(塩基性化合物)を構成成分とするリポソームの調製

ホスファチジルコリン37.5 μ mol、コレステロール37.5 μ mol、
15 1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン25 μ mol
を10mlのクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

これに生理食塩水5mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記(1-②)と同様の方法により、平均
20 粒子径が90~200nmでリポソーム分散液を得た。0.4mMポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体2mol%生食溶液とリポソーム分散液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、標記のリポソ-

ム分散液を得た。

(比較例 5)

1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (塩基性化合物) を構成成分とするリポソームの調製

- 5 ホスファチジルコリン 35 μmol 、コレステロール 35 μmol 、1, 2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン 30 μmol を 10 ml のクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

- 10 これに生理食塩水 5 ml を加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記(1-②)と同様の方法により、平均粒子径が90～200 nm でリポソーム分散液を得た。0.4 mM ポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体 4 mol% 生食溶液とリポソーム分散液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、標記のリポソーム分散液を得た。

15 (比較例 6)

ホスファチジルコリン 50 μmol 、コレステロール 50 μmol を 10 ml のクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

- 20 これに生理食塩水 5 ml を加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記(1-②)と同様の方法により、平均粒子径が90～200 nm でリポソーム分散液を得た。ポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体 0.12 mM 生食溶液とリポソーム分散

液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、本発明①の塩基性化合物と本発明②の酸性化合物を含まないリポソーム分散液を得た。

(比較例7)

ホスファチジルコリン45 μmol 、コレステロール45 μmol 、3, 5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩10 μmol を10mlのクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

これに生理食塩水5mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記(1-②)と同様の方法により、平均粒子径が90～200nmでリポソーム分散液を得た。ポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体0.12mM生食溶液とリポソーム分散液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、リポソーム分散液を得た。

(比較例8)

15 ホスファチジルコリン49 μmol 、コレステロール49 μmol 、ホスファチジン酸2 μmol を10mlのクロロホルムに溶解させてから、エバポレーターでクロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。

これに生理食塩水5mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記(1-②)と同様の方法により、平均粒子径が90～200nmでリポソーム分散液を得た。ポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体0.12mM生食溶液とリポソーム分散

液を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、アニオン性脂質を含むリポソーム分散液を得た。

(試験例1) 各種リポソームのプロテオグリカンとの親和性

- 5 この試験の目的は酸性下および中性付近において、リポソームと炎症部位や腫瘍部位などで過剰産生しているプロテオグリカンとの親和性を調べたものである。

(方法)

- プロテオグリカンに含まれるアニオン性糖鎖高分子であるグリコサミノグリカンを各実施例および各比較例のリポソームと混合したときに、各リポソームに吸着するグリコサミノグリカンの量を測定した。グリコサミノグリカンとしてコンドロイチン硫酸C(分子量:3万~6万)をpH7.4であるリン酸緩衝液に溶解させ0.1mg/mlとなるよう調製し、さらに6NHClによってpH6.0、あるいはpH6.5に調整した。得られたpH7.4あるいはpH6.0の
- 10 0.1mg/mlコンドロイチン硫酸C溶液0.3mlと、脂質濃度を生理食塩水によって10mMに調整した各リポソーム分散液0.3mlを混合し、37℃で1時間加温した。冷却後、10000gで1時間超遠心し、上清を採取した。上清中のコンドロイチン硫酸CをBlyscan proteoglycan assay kitにより定量し、各リポソームへのコンドロイチン硫酸Cの吸着量を算出した。

- 20 (結果)

結果を図1~3に示す。酸性化合物を含まない比較例1および酸性化合物がリン酸ジエステル誘導体である比較例2~5と7のリポソームは、pH6.0ある

いは6.5とpH7.4でコンドロイチン硫酸Cの吸着量は同じであった。塩基性化合物を含まない比較例6と8のリポソームはpH6.5でもpH7.4でもコンドロイチン硫酸Cが吸着しなかった。本発明にかかる実施例1～9のリポソームは、pH6.0あるいは6.5とpH7.4ではコンドロイチン硫酸Cの吸着量は差があり、pH7.4においては吸着量が抑えられることが確認された。すなわち、本発明のリポソームは中性付近ではプロテオグリカンに対する親和性が抑えられるのに対して酸性環境では高い親和性を有することが示された。

(試験例2) 各種リポソームの細胞に対する親和性の評価

10 (方法)

ヒト大動脈平滑筋初代細胞(Clonetics社製)を 3.8×10^4 cells/well となるように12-well culture plate (Falcon, Becton Dickinson社製)にまき、24時間培養した。RPMI1640 (シグマ社製)/10% FBS(pH 6.0またはpH7.4)の培地に変えて(1ml/well)、実施例9と比較例6～8のリポソームを15 50 μ g PC/well ずつ添加し、24時間反応させた(n=3)。PBS(-)で2回洗浄後、細胞溶解剤(50mM Tris(pH 8.0)/150mM NaCl/0.5% DOC/1% NP-40/0.1% SDS)で細胞を溶解し、蛍光強度測定した。蛍光強度からPC濃度を換算し、蛋白量で補正後、各リポソームの細胞への結合量を算出した。

(結果)

20 結果を図4に示す。比較例7のリポソームは、pH6.0とpH7.4で細胞への結合量はほぼ同じであった。比較例6と8のリポソームはpH6.0でもpH7.4でも細胞に結合しなかった。本発明にかかる実施例9のリポソーム

は、pH 6.0あるいは6.5とpH 7.4では細胞への結合量は差があり、pH 7.4においては結合量が抑えられることが確認された。すなわち、本発明のリポソームは中性付近では細胞に対する親和性が抑えられるのに対して酸性環境では高い親和性を有することが示された。

5

(試験例3) 急性毒性

この試験の目的は、本発明のリポソームの毒性が、従来のものの毒性と比較してどの程度であるかを知ることである。そのために、本発明のリポソームのラットに対する致死毒性試験を行った。

10 (方法)

実施例1～9のリポソーム分散液を限外ろ過膜を用いて濃縮し、さらに必要に応じて注射用滅菌蒸留水で希釈して被験液とした。検疫した5週齢のマウスを1群5匹に区分し、尾静脈より上記の被験液を100ml/kg投与した。一方、溶媒対照群は、生理食塩水を100ml/kg投与した。被験液投与後、7日間にわたって少なくとも1日1回、注意深く一般状態を観察して毒性徴候、死亡状況を記録した。また、7日後に剖検し、各臓器を摘出した。各臓器について病理切片を作成し観察を行った。

15

(結果)

本発明のリポソームはいずれも、観察期間中、死亡例を認めなかった。また、7日後の各臓器の病理観察においては、問題となるような病理所見は認められなかった。即ち、本発明のリポソームは、極めて毒性が低く、安全性の高いものであることが確認された。

20

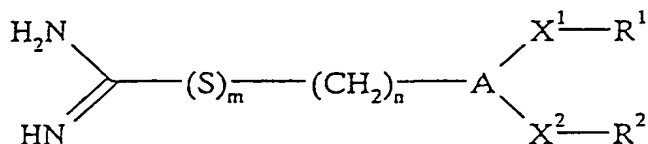
産業上の利用可能性

本発明のリポソームは、酸性領域下で炎症や腫瘍などのpHが低下した病巣部位へのターゲティング性が非常に高い。また、安全性も非常に高い。

- 従って、診断および／または治療を目的とする薬物を運搬する本発明の
- 5 リポソームは、炎症や腫瘍病変を起こした組織および／または臓器における診断及び治療という目的に対して非常に効果的である。

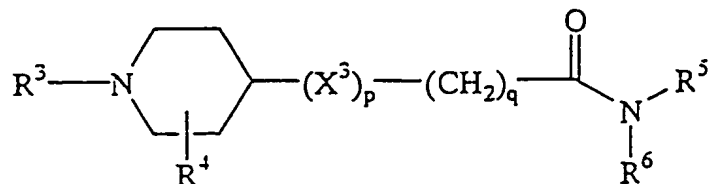
請 求 の 範 囲

1. 治療および／または診断を目的とする薬物を内包するリポソームであって、リポソーム膜構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物、および③、①②以外のリポソーム膜構成成分を含有し、pHが5～7の病巣部位に集積するリポソーム。
2. 前記塩基性化合物のモル比が、全リポソーム膜構成成分中の1～30mol%である請求項1記載のリポソーム。
3. 前記酸性化合物のモル比が、全リポソーム膜構成成分中の0.5～30mol%である請求項1または2に記載のリポソーム。
4. 前記塩基性化合物が、下記式1から4のいずれかで示される塩基性化合物である請求項1ないし3のいずれかに記載のリポソーム。



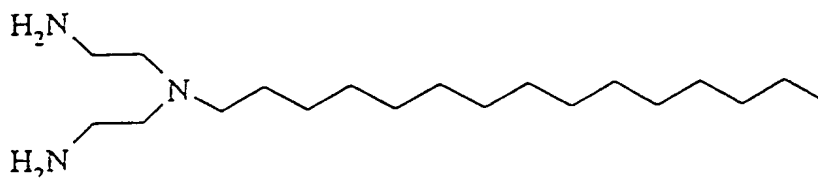
式1

(式1中、Aは芳香環を表す。R¹ 及びR² は炭素数10～25のアルキル基またはアルニケル基を表し、R¹ およびR² は同一であっても異なってもよい。X¹ およびX² は—O—、—S—、—COO—、—OCO—、—CONH—またはNHCO—を表し、X¹ およびX² は同一であっても異なってもよい。mは0または1、nは0または1～6の整数を表す。)

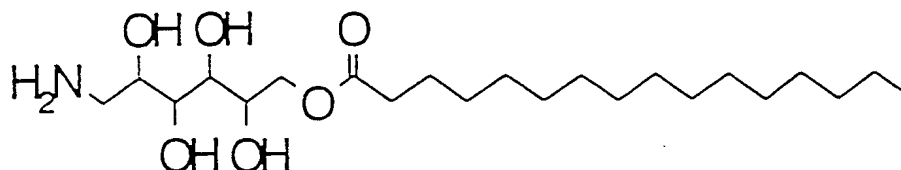


式 2

(式 2 中、 R^3 は水素または炭素数 1～8 のアルキル基もしくはアルニケル基を表す。 R^5 および R^6 は水素または炭素数 1～25 のアルキル基もしくはアルニケル基を表し(但し、 R^5 および R^6 が共に水素である場合を除く。)、 R^5 および R^6 は同一であっても異なってもよい。 X^3 は $-\text{O}-$ または $-\text{S}-$ を表す。 p は 0 または 1、 q は 0 または 1～10 の整数を表す。)



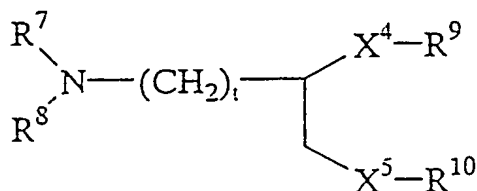
式 3



式 4

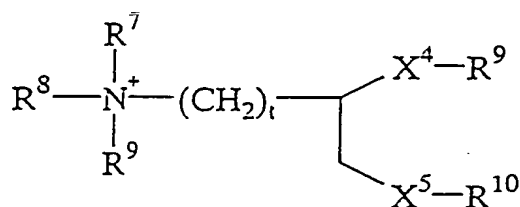
5. 前記塩基性化合物が、4級アミン又は3級アミンを有する塩基性化合物である請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載のリポソーム。

6. 前記塩基性化合物が、下記式 5 から 6 のグループから選ばれる請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載のリポソーム。



式 5

(式5中、 R^7 および R^8 は炭素数1～8のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^7 および R^8 は同一であっても異なってもよい。 X^4 および X^5 は—O—または—OCO—を表し、 X^4 および X^5 は同一であっても異なってもよい。 R^9 および R^{10} は炭素数10～20のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^9 および R^{10} は同一であっても異なってもよい。 t は1～6の整数を表す。)



式6

(式6中、 R^7 、 R^8 および R^9 は、炭素数1～8のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^7 、 R^8 および R^9 は同一であっても異なってもよい。 X^4 および X^5 は—O—または—OCO—を表し、 X^4 および X^5 は同一であっても異なってもよい。 R^9 および R^{10} は炭素数10～20のアルキル基またはアルケニル基を表し、 R^9 および R^{10} は同一であっても異なってもよい。 t は1～6の整数を表す。)

7. 前記リン酸モノエステル誘導体が、リン酸プレドニゾロン、リン酸リボフラビン、ホスファチジン酸から選ばれる請求項1ないし6のいずれかに記載のリポソーム。

8. 前記カルボキシル基またはその塩を有する化合物が、脂肪酸である請求項1ないし7のいずれかに記載のリポソーム。

9. 前記脂肪酸が、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸

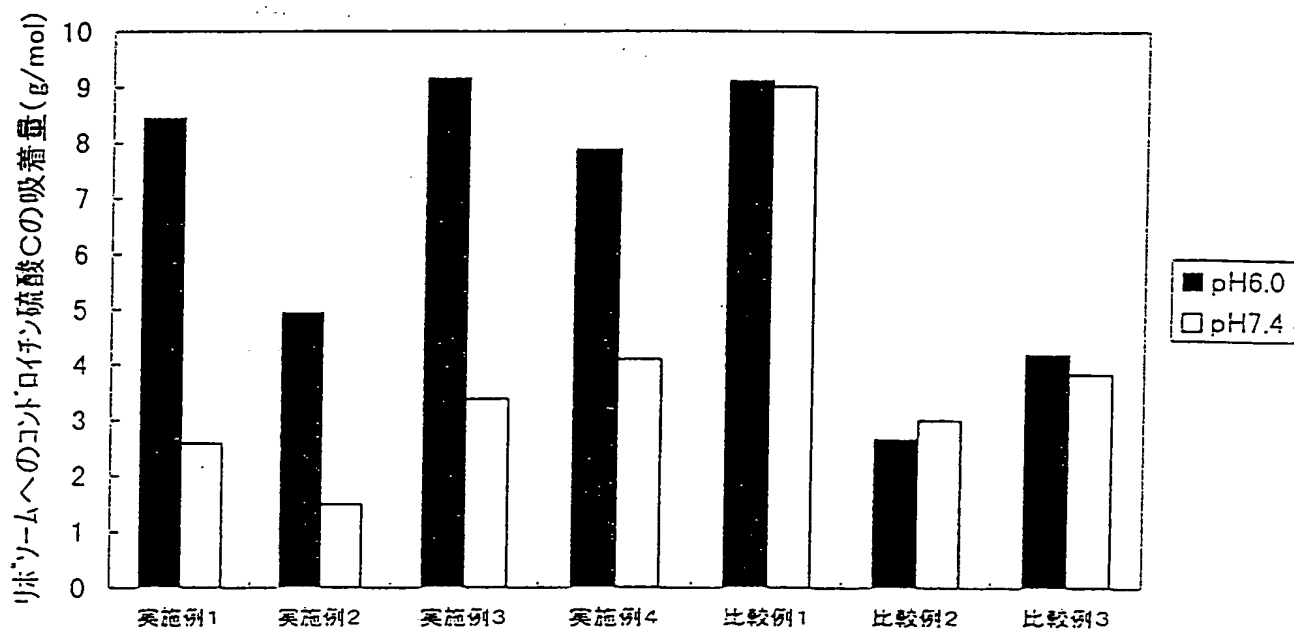
である請求項1ないし8のいずれかに記載のリポソーム。

10. 前記①②以外のリポソーム膜構成成分が、リン脂質あるいはその誘導体、および／またはステロールあるいはその誘導体である請求項1ないし9のいずれかに記載のリポソーム。
- 5 11. 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、酵素阻害剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメディエーターの遊離抑制剤、血管内皮細胞の増殖または抑制
- 10 剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、リポキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、NOS阻害剤、AGEs阻害剤あるいはラジカルスカベンジャーである請求項1ないし10のいずれかに記載のリポソーム。
- 15 12. 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体である請求項1ないし10のいずれかに記載のリポソーム。
13. 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、グリコサミノグリカンおよびその誘導体である請求項1ないし10のいずれかに記載のリポソーム。
- 20 14. 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、オリゴおよび／または多糖、およびそれらの誘導体である請求項1ないし10のいずれかに記載のリポソーム。

15. 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、タンパク質またはペプチドである請求項1ないし10のいずれかに記載のリポソーム。
16. 前記治療および／または診断を目的とする薬物が、X線造影剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬等の各種体内診断薬である
- 5 請求項1ないし10のいずれかに記載のリポソーム。
17. 治療および／または診断を目的とする薬物を内包するリポソーム膜構成成分に、pH6.5とpH7.4のリン酸緩衝液中におけるリポソームへのコンドロイチン硫酸Cの吸着量比が、pH6.5における吸着量／pH7.4における吸着量 \geq 1.5となるように①塩基性化合物と②リン酸モノエステル誘導
- 10 体またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物とを添加して、リポソームの病巣部位への集積率を高める方法。
18. リポソーム膜構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導體またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物、および③、①②以外のリポソーム膜構成成分を含有し、治療および／または診断を
- 15 目的とする薬物を内包するリポソームを、人を含む動物に投与して、pHが5～7の病巣部位に集積させる治療および／または診断方法。
19. リポソーム膜構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導體またはカルボキシル基またはその塩を有する化合物である酸性化合物、および③、①②以外のリポソーム膜構成成分を含有し、治療および／または診断を
- 20 目的とする薬物を内包するリポソームを、治療および／または診断を目的とする薬物をpHが5～7の病巣部位に集積させるために使用する方法。

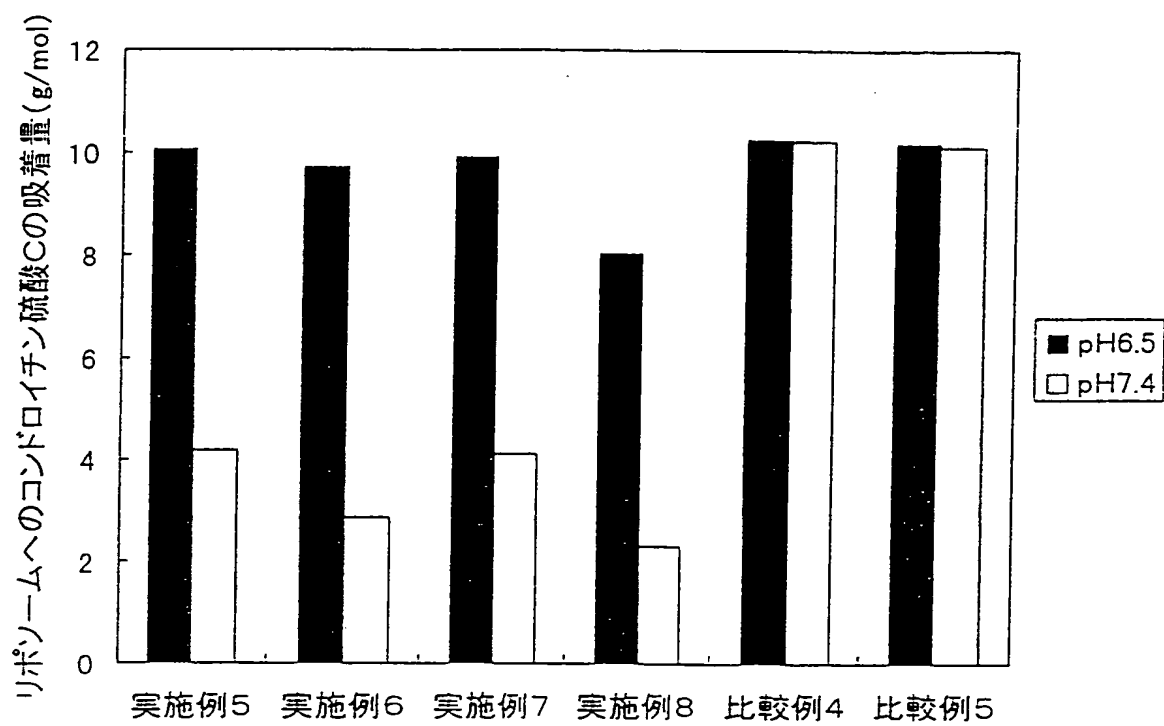
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1



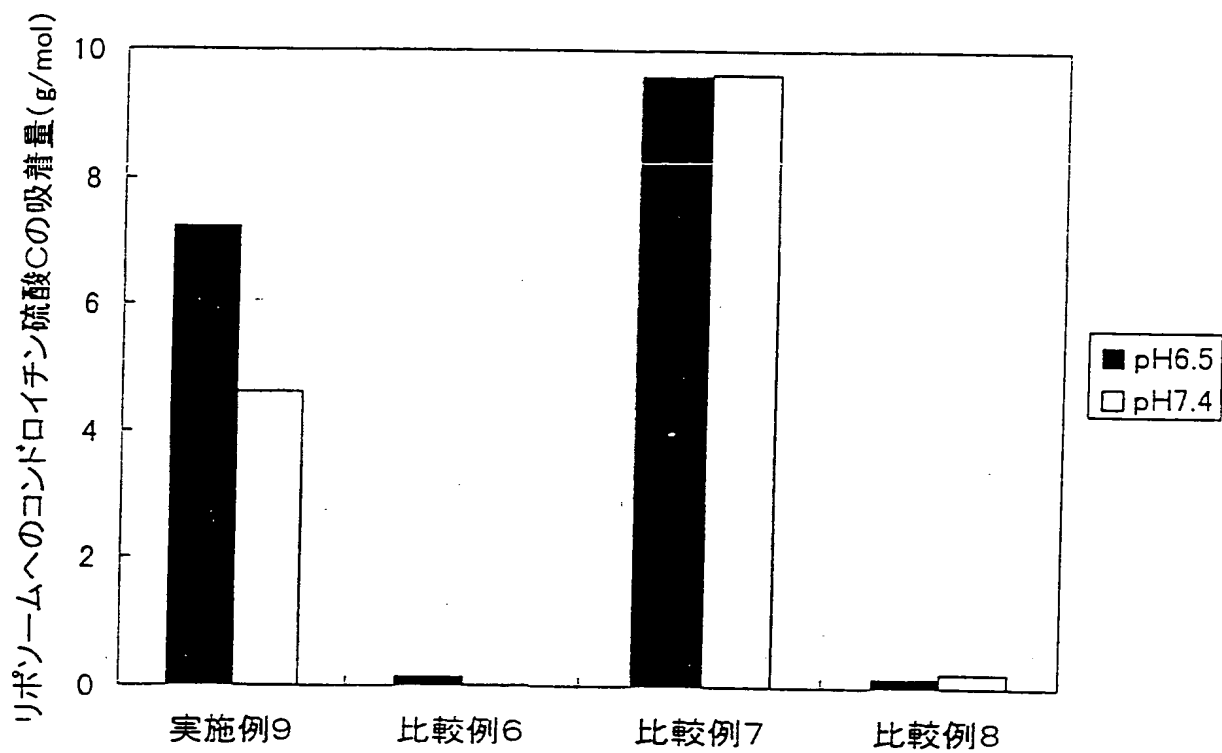
THIS PAGE BLANK (USPIC)

図 2



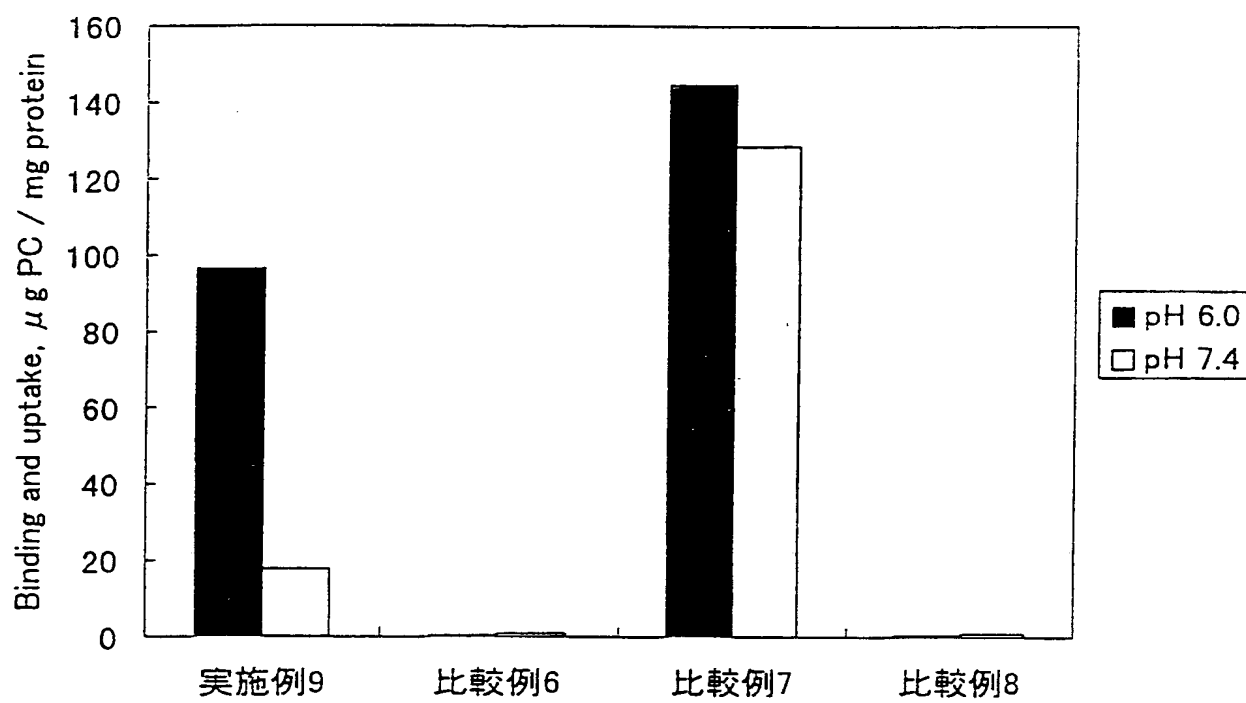
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ A61K9/127, A61K47/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K9/127, A61K47/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 9-263579, A (TERUMO CORORATION), 07 October, 1997 (07.10.97), Full text (Family: none)	1, 2, 4, 5, 7, 10-16 3, 6, 8, 9
X A	JP, 10-120595, A (TERUMO CORORATION), 12 May, 1998 (12.05.98), Full text (Family: none)	1, 2, 5, 7, 10-16 3, 4, 6, 8, 9
A	JP, 7-145038, A (TERUMO CORORATION), 06 June, 1995 (06.06.95), Full text (Family: none)	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 September, 2000 (14.09.00)

Date of mailing of the international search report
26 September, 2000 (26.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04182

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17-19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 17 to 19 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/04182

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K9/127, A61K47/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K9/127, A61K47/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP, 9-263579, A (テルモ株式会社) 7. 10月. 1997 (07. 10. 97), 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5, 7, 10-16 3, 6, 8, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 09. 00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保

印

4P

2939

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 10-120595, A (テルモ株式会社) 12. 5月. 1998 (12. 05. 98), 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 5, 7, 10-16
A		3, 4, 6, 8, 9
A	J P, 7-145038, A (テルモ株式会社) 6. 6月. 1995 (06. 06. 95), 全文 (ファミリーなし)	1-16

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとその国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/PRTS

10/018930-

531 Rec'd PCT 26 DEC 2001

DESCRIPTION

LIPOSOME

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a liposome including a drug.

BACKGROUND ART

In recent years, there have been increasing studies on drug delivery system (DDS) that can perform unfailingly, efficiently and safely targeting a drug, DNA, peptide and protein to an objective site, i.e., a diseased site, for example, cancer, pneumonia, hepatitis, nephritis, lymphoma, injured site of vascular endothelia or the like.

There may be cited, for example, a method in which closed vesicles such as liposome, emulsions, lipid microspheres, and nano particles are utilized as a drug carrier, a method in which a drug is included in or bound to a polymer carrier such as high molecular synthetic polymer micelle or polysaccharide, a method in which such a closed vesicle or a polymer carrier is modified on its surface with a high molecular functional molecule such as antibody or protein, or a low molecular functional molecule

THIS PAGE BLANK (USPTO)

such as a specified sugar chain, peptide or the like to increase target directivity, and so forth. However, there are various problems to be overcome in practical use of these drug carriers. Among them, difficulty of evasion from the foreign matter recognizing mechanism of organism and control of pharmacokinetics in the body cause problems. In particular, closed vesicles have been difficult to perform delivery to a targeted tissue or cell with high selectivity due to its aggregation by the interaction with opsonin protein or plasma protein in blood or capture in reticuloendothelial system tissue (RES) such as liver or spleen.

As a means for solving this problem, it has been made possible to prevent adsorption of plasma protein, opsonin protein or the like to increase the stability in blood to evade capture in the RES by coating the surface of a polymer carrier inclusive of the closed vesicles with a hydrophilic polymer such as polyethylene glycol (PEG). Closed vesicles such as liposome are passively accumulated in a tissue in which the vascular permeability has been augmented in tumor tissues or at inflammatory sites because they can provide long residence in blood. This makes it possible to perform efficient treatment. On the other hand, in the case where the closed vesicles have acquired

THIS PAGE BLANK (USPTO)

properties of evading RES on the basis of the above-mentioned modification, the interaction between liposome and the target tissue is decreased. This improves the delivery of the closed vesicles to the target tissue. On the contrary, this causes defects in that the efficiency of incorporation of the closed vesicles by the cells in the target tissue is decreased to thereby decrease the efficiency of delivery of a drug enclosed in the closed vesicles to the cells, or the disintegration of liposome caused by the interaction with a biocomponent such as protein in blood is inhibited, with the result that the release rate of the drug enclosed in the closed vesicles is decreased.

Many liposomes comprising basic compounds as membrane components have hitherto been studied as tools for transporting genes into cells. Liposomes comprising various basic compounds in the membranes have affinity for substances having a negative charge. In particular, the cell surface is constituted by a substance having a negative charge like a sulfated polysaccharide such as heparan sulfate and hence liposomes comprising basic compounds are expected to have strong affinity for the cell membrane. However, such a liposome comprising a basic compound when it is administered in blood binds to a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

substance having a negative charge such as protein in serum or the surface of erythrocyte membrane, so that the surface charge is changed or aggregation in blood is caused and loss of affinity for the cell membrane is concerned about. Therefore, a drug delivery system is desired that circulates stably having no interaction with protein or cells in blood flow and has increased interaction with cells only in a diseased site so that it can deliver the drug to the cells.

To solve these problems, various environment responsive drug carriers, that is, drug carriers that change properties in response to a change in environment due to diseases, or a difference in environment between a normal tissue and a diseased site have been studied. For example, it is known that at a diseased site such as tumor or inflammation, local pH is lowered as compared with normal tissue (V. Menkin, Biochemical Mechanism in Inflammation, Thomas, Springfield, III, pp.69-7 (1956)) and studies have been approached directed to releasing or targeting a drug in response to an environment due to a pH change at such a lesion site (Biochim Biophys Acta, 1329(2), 291-301 (1997); FEBS, 421(1), 61-4 (1998)). However, no report has been made yet on a liposome that responds to a change in pH, improving target directivity

THIS PAGE BLANK (USPTO)

thereof.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

The present invention has been made to overcome the defects of conventional target directive liposome and provide a target directive liposome that responds to any environmental change. That is, an object of the present invention is to provide a liposome that exhibits target directive capability for a drug, DNA, peptide and protein by a change in pH at a diseased site.

The liposome of the present invention under such a physiological pH condition as in circulating blood weakly interacts with a substance having a negative charge, and hence it interacts with cells and proteins less frequently, whereby it is stable also in blood. However, at a target site where pH is decreased such as an inflammatory site or a tumor site, its interaction with a substance having a negative charge is enhanced, and thus its affinity for cells is improved, and it is efficiently accumulated at the target site along with that its accumulation outside the target site is prevented. As a result, an effect of alleviation of side effects can be expected.

The above-mentioned problems can be solved by the present invention as described below.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(1) The present invention relates to a liposome that includes a drug intended for the therapy and/or diagnosis, comprising as membrane constituents [1] a basic compound, [2] an acidic compound selected from a phosphoric acid monoester derivative, or a compound having a carboxyl group or its salt, and [3] a liposome membrane constituent other than [1] and [2].

(2) The present invention relates to a liposome that includes a drug intended for the therapy and/or diagnosis, comprising as membrane constituents [1] a basic compound, [2] an acidic compound selected from a phosphoric acid monoester derivative, or a compound having a carboxyl group or its salt, and [3] other liposome membrane constituent, that is efficiently accumulated at a diseased site such as an inflammatory site or a tumor site in an environment of pH 5 to 7.

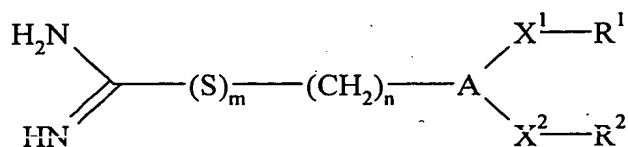
(3) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which a molar ratio of the basic compound is 1 to 30 mol% of total liposome membrane constituents.

(4) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which a molar ratio of the acidic compound, which is a phosphoric acid monoester derivative or a carboxylic acid derivative, is 0.5 to 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

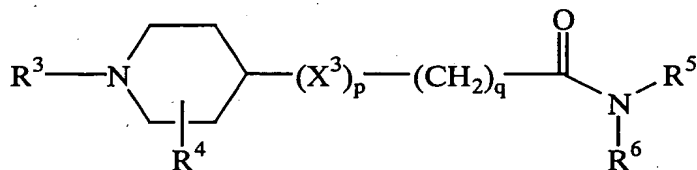
mol% of total liposome membrane constituents.

(5) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the basic compound is represented by any one of the following Formulae 1 to 4:



Formula 1

(in Formula 1, A represents an aromatic ring. R^1 and R^2 represent an alkyl group or alkenyl group having 10 to 25 carbon atoms, where R^1 and R^2 may be the same or different. X^1 and X^2 represent $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{COO}-$, $-\text{OCO}-$, $-\text{CONH}-$ or $\text{NHCO}-$, where X^1 and X^2 may be the same or different. m is 0 or 1, and n is 0 or an integer of 1 to 6.)

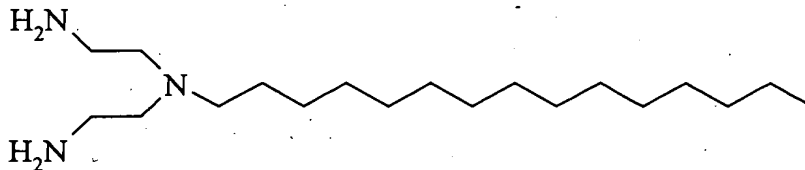


Formula 2

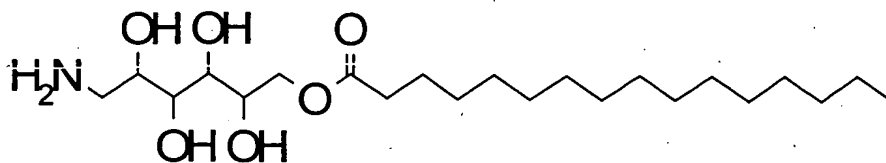
(in Formula 2, R^3 represents hydrogen or an alkyl group or alkenyl group having 1 to 8 carbon atoms. R^5 and R^6 represent hydrogen or an alkyl group or alkenyl group having 1 to 25 carbon atoms, (except for the case where both R^5 and R^6 are hydrogen), where R^5 and R^6 may be the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

same or different. X^3 represents -O- or -S-. p is 0 or 1, and q is 0 or an integer of 1 to 10).



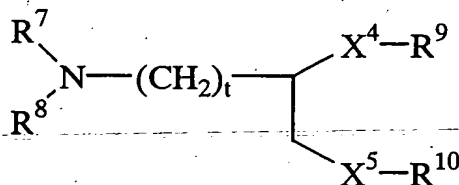
Formula 3



Formula 4

(6) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the basic compound is a basic compound having a quaternary amine or a tertiary amine.

(7) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the basic compound is selected from the group consisting of the following Formulae 5 and 6.

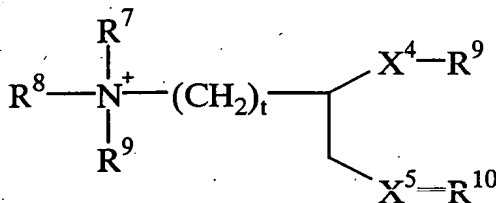


Formula 5

(in Formula 5, R^7 and R^8 represent an alkyl group or alkenyl group having 1 to 8 carbon atoms, where R^7 and R^8 may be the same or different. X^4 and X^5 represent -O- or -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

OCO-, where X^4 and X^5 may be the same or different. R^9 and R^{10} represent an alkyl group or alkenyl group having 10 to 20 carbon atoms, where R^9 and R^{10} may be the same or different. t is an integer of 1 to 6.)



Formula 6

(in Formula 6, R^7 , R^8 and R^9 represent an alkyl group or alkenyl group having 1 to 8 carbon atoms, where R^7 , R^8 and R^9 may be the same or different. X^4 and X^5 represent -O- or -OCO-, where X^4 and X^5 may be the same or different. R^9 and R^{10} represent an alkyl group or alkenyl group having 10 to 20 carbon atoms, where R^9 and R^{10} may be the same or different. t is an integer of 1 to 6.)

(8) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the phosphoric acid monoester derivative is selected from predonisolone phosphate, riboflavin phosphate, and phosphatidic acid.

(9) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the acidic compound, which is a compound having a carboxyl group or its salt, is a fatty acid.

(10) The present invention relates to the liposome

THIS PAGE BLANK (USPTO)

according to the above item (9), in which the fatty acid is oleic acid, stearic acid, palmitic acid, or myristic acid.

(11) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the other liposome membrane constituent is phospholipid or its derivative, and/or sterol or its derivative.

(12) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the drug intended for the therapy and/or diagnosis is an anti-cancer agent, an antibiotic, an enzyme agent, an enzyme inhibitor, an antioxidant, a lipid uptake inhibitor, a hormone agent, an anti-inflammatory agent, a steroid agent, a vasodilator, an angiotensin converting enzyme inhibitor, an angiotensin receptor antagonist, a growth/migration inhibitor for smooth muscle cells, a platelet aggregation inhibitor, an anticoagulant, a chemical mediator releasing inhibitor, a vascular endothelial cell growth or suppressing agent, an aldose reductase inhibitor, a mesangium cell growth inhibitor, a lipoxxygenase inhibitor, an immunosuppressor, an immunoactivator, an antiviral agent, a Maillard reaction inhibitor, an amyloidosis inhibitor, an NOS inhibitor, an AGEs inhibitor, or a radical scavenger.

(13) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the drug intended

THIS PAGE BLANK (USPTO)

for the therapy and/or diagnosis is a nucleic acid, a polynucleotide, a gene and its analogue.

(14) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the drug intended for the therapy and/or diagnosis is glycosaminoglycan or its derivative.

(15) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the drug for the therapy and/or diagnosis is oligo- and/or polysaccharide, or its derivative.

(16) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the drug intended for the therapy and/or diagnosis is protein or peptide.

(17) The present invention relates to the liposome according to the above item (1), in which the drug intended for the therapy and/or diagnosis is an intracorporeal diagnostic drug such as an X-ray contrast medium, a radiolabeled nuclear medicinal diagnostic drug or a nuclear magnetic resonance diagnostic drug for diagnosis.

(18) A method of increasing a ratio of accumulation of liposome at a diseased site, comprising adding to a liposome base material including a drug for a therapy and/or diagnosis [1] a basic compound and [2] an acidic compound, which is a phosphoric acid monoester derivative

THIS PAGE BLANK (USPTO)

or a compound having a carboxyl group or its salt, such that a ratio of an adsorption amount of chondroitin sulfate C to liposome in a phosphate buffer of pH 6.5 to that in a phosphate buffer of pH 7.4 is at least 1.5.

To the liposome of the present invention, a lipid derivative of a hydrophilic polymer as a surface modifying agent may be added as needed, and its molecular weight is desirably 1,000 to 7,000. As the lipid derivative of the hydrophilic polymer, polyethylene glycol derivatives are desirable. In particular, compounds having a polyethylene glycol chain and diacyl glycerol in one molecule are desirable.

(19) A method for the therapy and/or diagnosis, comprising administering to an animal including a human a liposome including a drug for the therapy and/or diagnosis comprising as liposome membrane constituents [1] a basic compound, [2] an acidic compound, which is a phosphoric acid monoester derivative or a compound having a carboxyl group or its salt, and [3] liposome membrane constituent other than the above items [1] and [2] to accumulate it at a diseased site at a pH of 5 to 7.

(20) A method of using a liposome including a drug intended for the therapy and/or diagnosis comprising as liposome membrane constituents [1] a basic compound, [2] an

THIS PAGE BLANK (USPTO)

acidic compound, which is a phosphoric acid monoester derivative or a compound having a carboxyl group or its salt, and [3] liposome membrane constituent other than the above items [1] and [2] for accumulating the drug intended for the therapy and/or diagnosis at a diseased site at a pH of 5 to 7.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Fig. 1 is a graph illustrating affinity of each liposome to proteoglycan (chondroitin sulfate C).

Fig. 2 is a graph illustrating affinity of each liposome to proteoglycan (chondroitin sulfate C).

Fig. 3 is a graph illustrating affinity of each liposome to proteoglycan (chondroitin sulfate C).

Fig. 4 is a graph illustrating affinity of each liposome to human aorta smooth muscle primary cell.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

Hereinafter, explanation will be made on embodiments of the present invention. The constituent of the liposome of the present invention is composed of a basic compound that gives to a membrane a positive charge from at near physiological pH to acidic conditions when it is embedded in the membrane by itself, an acidic compound that has a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

negative charge at physiological pH but ionization of which is suppressed to decrease a negative charge at near physiological pH to acidic side when it is embedded into the membrane by itself, and another liposome constituent components. It is not particularly limited and can be used as far as it forms a microspheric structure and has safety.

Here, the physiological pH condition means the pH in the living body, that is, around 7.4, approximately in the range of 7.2 to 7.6. The acidic side than near physiological pH indicates the acidic side than near pH 7.4, that is, the acidic side approximately at a pH in the range of 6 to 8. The acidic compounds, whose dissociation is prevented from this region, are expected to exhibit the performance due to a combination with the basic compound. However, compounds whose dissociation is prevented only in extremely acidic region such as pH 4 or less, for example, phosphoric acid diester derivatives, do not have such an action and hence are not included in the acidic compound of the present invention as will be apparent from the examples described hereinbelow.

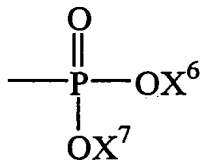
Specific examples of the constituent of liposome membrane of the present invention include the basic compound represented by any one of the Formulae 1 to 6 above, an acidic compound, which is a phosphoric acid

THIS PAGE RI ANK (ISPTO)

monoester derivative or a compound having a carboxyl group or its salt, and another liposome membrane constituent, and it is not particularly limited and can be used as far as it forms a microspheric structure and has safety.

As the basic compound represented by any one of the Formulae 1 to 4 above, each may be properly selected and used. In particular, amidine derivatives, piperidine derivatives, primary amine derivatives, secondary amine derivatives, tertiary amine derivatives, quaternary amine derivatives, and so forth are desirable. The amount of the basic compound is preferably 1 to 30, further 5 to 30 mol% of the total liposome membrane constituent. In this range, the accumulation to a diseased site such as an inflammatory site or a tumor site at a pH of 5 to 7 is increased.

The phosphoric acid monoester derivative refers to a compound having a phosphonato group, the phosphonato group being



Formula 7

(X⁶ and X⁷ represent hydrogen or a pharmaceutically acceptable cation such as sodium or potassium, where X⁶ and X⁷ may be the same or different.)

There is no particular limitation thereon unless the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

structural stability of liposome is deteriorated. Specifically, there can be mentioned phosphoesters of steroid such as prednisolone phosphate, riboflavin phosphate, and phosphatidic acid. In particular, the acidic compound, which is phosphoric acid monoester derivative is desirable as a constituent of the liposome of the present invention since it is specifically accumulated at a diseased site such as an inflammatory site or a tumor site in the region of acidic pH.

The compound having a carboxyl group or its salt is a compound having a -COOX^8 group, where X^8 represents hydrogen or a pharmaceutically acceptable cation such as sodium or potassium. A fatty acid is not particularly limited unless the structural stability of liposome is deteriorated. Specifically, there can be cited natural or synthetic oleic acid, palmitic acid, stearic acid, myristic acid, linolenic acid and so forth.

The amount of the acidic compound, which is a phosphoric monoester derivative or a carboxylic acid derivative, is preferably 0.5 to 30 mol% of the total liposome membrane constituent. In this range, accumulation at a diseased site such as an inflammatory site or a tumor site at a pH of 5 to 7 is increased.

The present invention is characterized by adding in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

addition to [1] a basic compound, [2] a specified acidic compound as liposome membrane constituent.

Phosphatidylcholine that has been conventionally used as a lipid is a phosphoric acid diester compound. However, this is a dipolar ionic compound having an acidic group and a basic group in one molecule and is neutral at near physiological pH.

As the other liposome membrane constituents excluding the above-mentioned basic compound and the above-mentioned acidic compound, there can be cited phospholipids and sterols such as cholesterol. As the phospholipid, there can be cited natural or synthetic phospholipids, for example, phosphatidylcholine (lecithin), phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, sphingomyelin, cardiolipin and so forth, and those obtained by hydrogenating these by a common method.

The liposome membrane of the present invention may further contain a stabilizer, which includes, for example, sterol such as cholesterol, and sugars such as glycerol and sucrose that decrease membrane fluidity. As an antioxidant, there can be cited, for example, tocopherol homologues, that is, vitamin E. Tocopherol exists as four isomers α , β , γ and δ . Any one may be used in the present

THIS PAGE BLANK (USPTO)

invention.

A lipid derivative of a hydrophilic polymer that modifies the liposome surface is not particularly limited unless it deteriorates the structural stability of liposome. There can be cited, for example, polyethylene glycol, dextran, pullulan, ficoll, polyvinyl alcohol, synthetic polyamino acid, amylose, amylopectin, mannan, cyclodextrin, pectin, carrageenan, and derivatives thereof. Among them, polyethylene glycol and polyethylene glycol derivatives are desirable.

The molecular weight of the lipid derivative of the hydrophilic polymer is preferably 1,000 to 7,000. In particular, polyethylene glycol and polyethylene glycol derivatives having a molecular weight of 1,000 and 7,000 have considerable effect of improving retention in blood and thus are preferred. The polyethylene glycol derivative is not particularly limited. However, it is preferably a compound having a polyethylene glycol chain and a diacyl glycerol in one molecule.

To modify the liposome surface with the hydrophilic polymer, various methods may be cited and not particularly limited. However, a method in which the above-mentioned hydrophilic polymer is bound to a hydrophobic compound such as a long-chain aliphatic alcohol, sterol, a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

polyoxypropylene alkyl, a glycerol fatty acid ester or a phospholipid and the part of the hydrophobic compound is inserted into the liposome surface is preferred.

As a drug for the diagnosis and/or therapy, pharmaceutically acceptable pharmacologically active substance, physiologically active substance and/or substance for diagnosis may be used depending on the purpose. The kind of drug is not particularly limited unless the formation of liposome is not damaged.

Specifically, there may be cited an anti-cancer agent, an antibiotic, an enzyme agent, an antioxidant, a lipid uptake inhibitor, a hormone agent, an anti-inflammatory agent, a steroid agent, a vasodilator, an angiotensin converting enzyme inhibitor, an angiotensin receptor antagonist, a growth/migration inhibitor for smooth muscle cells, a platelet aggregation inhibitor, an anticoagulant, a chemical mediator releasing inhibitor, a vascular endothelial cell growth accelerating or suppressing agent, an aldose reductase inhibitor, a mesangium cell growth inhibitor, a lipoxygenase inhibitor, an immunosuppressor, an immunoactivator, an antiviral agent, a Maillard reaction inhibitor, an amyloidosis inhibitor, a nitrogen monoxide synthesis inhibitor, an advanced glycation endproducts inhibitor, a radical scavenger, a protein, a peptide, a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

nucleic acid, a polynucleotide, a gene and its analogues and so forth.

For example, as the examples of anti-cancer agent, there can be cited cyclophosphamide, ifosfamide, nitrogen mustard N-oxide hydrochloride, thiotepa, busulfan, carboquone, nimustine hydrochloride, ranimustine, melphalan, improsulfan tosylate, dacarbazine, procarbazine hydrochloride, cytarabine, cytarabine oxfate, enocitabine, mercaptopurine, thioinosine, fluorouracil, doxifluridine, tegafur, methotrexate, carmofur, hydroxycarbamide, vincristine sulfate, vinblastine sulfate, vindesine sulfate, etoposide, cromomycin A₃, daunorubicin hydrochloride, doxorubicin hydrochloride, aclarubicin hydrochloride, pirarubicin, epirubicin hydrochloride, dactinomycin, mitoxantrone hydrochloride, bleomycin hydrochloride, peplomycin sulfate, mitomycin C, neocarzinostatin, L-asparaginase, aceglatone mitobronitol, sodium dextran sulfate, octreotide acetate, cisplatin, carboplatin, tamoxifen citrate, medroxyprogesterone acetate, sodium estramustine phosphate, goserelin acetate, leuprorelin acetate, irinotecan hydrochloride and so forth.

As the antibiotics, there can be cited benzylpenicillin potassium, benzylpenicillin benzathine, phenoxymethylpenicillin potassium, phenethicillin

THIS PAGE BLANK (USPTO)

potassium, cloxacillin sodium, flucloxacillin sodium,
ampicillin, sultamicillin tosylate, bacampicillin
hydrochloride, talampicillin hydrochloride, lenampicillin,
hetacillin potassium, ciclacillin, amoxicillin,
pivmecillinam hydrochloride, aspoxicillin, carbenicillin
sodium, carindacillin sodium, sulbenicillin sodium,
ticarcillin sodium, piperacillin sodium, cephaloridine,
cephalotin sodium, cefazolin sodium, cefapirin sodium,
cefradine, cephalixin, cefatrizine propylene glycol,
cefroxadine, cefaclor, cefadroxil, cefotiam hydrochloride,
cefotiam hexetil hydrochloride, cefuroxime sodium,
cefuroxime axetil, cefamandole sodium, cefdinir, cefetamet
pivoxil hydrochloride, ceftibuten, cefmetazole sodium,
cefoxitin sodium, cefotetan sodium, cefminox sodium,
cefbuperazone sodium, cefpiramide sodium, cefsulodin
sodium, cefotaxime sodium, cefoperazone sodium, ceftizoxime
sodium, cefmenoxime hydrochloride, ceftriaxone sodium,
ceftazidime, sodium cefpimizole, cefixime, cefteram
pivoxil, cefuzonam sodium, cefpodoxim proxetil, cefodizime,
cefprome sulfate, latamoxef sodium, flomoxef sodium,
imipenem, cilastatin sodium, aztreonam, carumonam sodium,
streptomycin sulfate, kanamycin sulfate, fradiomycin
sulfate, amikacin sulfate, gentamicin sulfate, paromomycin
sulfate, bekanamycin sulfate, ribostamycin sulfate,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dibekacin sulfate, tobramycin, sisomicin sulfate, micronomicin sulfate, astromicin sulfate, netilmicin sulfate, isepamicin sulfate, arbekacin sulfate, erythromycin, kitasamycin, acetylkitasamycin, oleandomycin phosphate, josamycin, acetylspiramycin, midecamycin, midecamycin acetate, rokitamycin, roxithromycin, clarithromycin, tetracycline hydrochloride, oxytetracycline hydrochloride, tetracycline metaphosphate, demethylchlortetracycline hydrochloride, rolitetracycline, doxycycline hydrochloride, minocycline hydrochloride, chloramphenicol, chloramphenicol succinate sodium, chloramphenicol palmitate, thiamphenicol, thiamphenicol aminoacetate hydrochloride, colistin sulfate, colistin methanesulfonate sodium, polymyxin B sulfate, bacitracin, vancomycin hydrochloride, lincomycin hydrochloride, clindamycin, spectinomycin hydrochloride, fosfomycin sodium, fosfomycin calcium, and so forth.

As examples of the enzyme agent, there can be cited chymotrypsin, crystalline trypsin, streptokinase, streptodornase, hyaluronidase, urokinase, nasaruplase, alteplase, lysozyme chloride, semialkaline protinase, serrapeptase, tisokinase, duteplase, batroxobin, pronase, promeline, and so forth.

As examples of the antioxidant, there can be cited

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tocopherol, ascorbic acid, uric acid and so forth.

As examples of the anti-inflammatory agent, there can be cited choline salicylate, sasapyrine, sodium salicylate, aspirin, diflunisal, frufenamic acid, mefenamic acid, floctafenine, tolfenamic acid, diclofenac sodium, tolmetin sodium, sulindac, fenbufen, felbinac ethyl, indomethacin, indomethacin farnesil, acemetacin, proglumetacin maleate, amfenac sodium, nabumetone, ibuprofen, flurubiprofen, flurubiprofen axetil, ketoprofen, naproxen, protizinic acid, pranoprofen, fenoprofen calcium, tiaprofenic acid, oxaprozin, loxoprofen sodium, alminoprofen, zaltoprofen, phenylbutazone, clofezone, ketophenylbutazone, piroxicam, tenoxicam, ampiroxicam, tiaramide hydrochloride, tinoridine hydrochloride, benzydamine hydrochloride, epirizole, emorfazone, and so forth.

As examples of the steroid agent, there can be cited cortisone acetate, hydrocortisone (phosphoester, acetate), hydrocortisone butyrate, hydrocortisone succinate sodium, prednisolone (acetate, succinate, tertiary butylacetate ester, phosphoester), methyprednisolone (acetate), methylprednisolone succinate sodium, triamcinolone, triamcinolone acetonide (triamcinolone acetate), dexamethasone (phosphoester, acetate, sodium phosphate, sulfuric acid ester), dexamethasone palmitate,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

betamethasone (phosphate, disodium salt), paramethasone acetate, fludrocortisone acetate, halopredone acetate, clobetasol propionate, halcinonide, beclomethasone propionate, betamethasone valerate, betamethasone acetate, cortisone acetate, and so forth.

As examples of the angiotensin converting enzyme inhibitor, there can be cited alacepril, imidapril hydrochloride, temocapril hydrochloride, delapril hydrochloride, benazepuril hydrochloride, captopril, cilazapril, enalapril maleate, lisinopril, and so forth.

As examples of the vasodilator, there can be cited theophylline, diprophylline, proxyphylline, aminophylline, choline theophylline, prostaglandin, prostaglandin derivatives, alprostadil alfadex, alprostadil, limaprost alfadex, papaverine, cyclandelate, cinnarizine, bencyclane fumarate, cinepazide maleate, dilazep hydrochloride, trapidil, difenidol hydrochloride, nicotinic acid, inositol hexanicotinate, nicametate citrate, nicotinic alcohol tartrate, tocopherol nicotinate, hepronicate, isoxsuprine hydrochloride, bamethan sulfate, torarizone hydrochloride, dihydroergotoxine mesylate, ifenprodil tartrate, moxislyte hydrochloride, nicergoline, nicardipine hydrochloride, nilvadipine, nifedipine, benidipine hydrochloride, diltiazem hydrochloride, nisoldipine, nitrendipine,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

manidipine hydrochloride, barnidipine hydrochloride, efonidipine hydrochloride, verapamil hydrochloride, trimetazidine hydrochloride, captopril, enalapril maleate, alacepril, delapril hydrochloride, cilazapril, lisinopril, benazepuril hydrochloride, hydralazine hydrochloride, todralazine hydrochloride, budralazine, cadralazine, indapamide, carbochromen hydrochloride, efloxate, etafenone hydrochloride, oxyfedrine hydrochloride, nicorandil, amyl nitrite, isosorbide nitrate, and so forth.

As examples of the growth/migration inhibitor for smooth muscle cells, there can be cited heparin sodium, dalteparin sodium (low molecular heparin), heparin calcium, dextran sulfate, and so forth.

As examples of the platelet coagulation inhibitor, there can be cited ticlopidine hydrochloride, cilostazol, ethyl icosapentate, beraprost sodium, salpgrelate hydrochloride, batroxobin, dipyridamole, and so forth.

As examples of the anticoagulant, there can be cited sodium heparin, sodium dalteparin (low molecular heparin), calcium heparin, dextran sulfate, warfarin potassium, argatroban, and so forth.

As examples of the chemical mediator releasing inhibitor, there can be cited tranilast, ketotifen fumarate, azelastine hydrochloride, oxatomide, amlexanox,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

repirinast, and so forth.

As examples of the immunosuppressor, there can be cited cyclosporine and so forth.

As examples of the antiviral agent, there can be cited aciclovir, ganciclovir, didanocine, zidovudine, sorivudine, vidarabine, and so forth.

The kind of drug for diagnosis to be included is not particularly limited unless it does not harm the formation of drug carrier. Specifically, X-ray contrasting medium, radiolabeled nuclear medicine diagnostic drug, a nuclear magnetic resonance diagnostic drug for diagnosis, and so forth.

For example, as examples of X-ray contrast medium, there can be cited amidotrizoate meglumine, iotalamate sodium, iotalamate meglumine, gastrographin, iodamide meglumine, lipiodol ultrafluid, adipiodone meglumine, ioxaglic acid, iotroxate meglumine, iotrolan, iopanoic acid, iopamidol, iothexol, ioversol, iopodate sodium, iomeprol, isopaque, iodoxamic acid, and so forth.

The liposome of the present invention can be readily obtained by a common method. One example of such a method will be described below. Constituents such as a basic compound and an acidic compound, and other constituents such as a phospholipid, a stabilizer, and antioxidant are

THIS PAGE BLANK (USPTO)

mixed in an organic solvent such as chloroform in a flask and the organic solvent is evaporated. Thereafter, drying under vacuum is performed to form a thin film on the inner wall of the flask. Then, a drug is added to the flask and vigorous stirring is performed, thereby obtaining a liposome dispersion. The obtained liposome dispersion is centrifuged and the supernatant is decanted to remove the drug that has not been encapsulated. Optionally, a lipid derivative solution of hydrophilic polymer may be further added as needed and the mixture is heated to obtain the liposome of the present invention.

The liposome of the present invention can be obtained also by adding a lipid derivative solution of hydrophilic polymer at the time of mixing the constituents. The method of adding the lipid derivative solution of hydrophilic polymer can be performed at any time without causing a particular problem. However, in the case of the method of adding it at the time of mixing the constituents, the lipid derivative of hydrophilic polymer is incorporated also in the inside of liposome and it may be sometimes the case that there occurs a substantial decrease in surface modification ratio and a decrease in encapsulated volume.

As an alternative method, the constituents may be mixed and the mixture may be discharged at a high pressure

THIS PAGE BLANK (USPTO)

by use of a high pressure discharging type emulsifier to obtain the liposome of the present invention.

The method of administering the liposome of the present invention is not particularly limited and the administration is intravenous administration as a solution or the like method. The liposome of the present invention when administered to living organisms specifically accumulates in a region of acidic pH such as an inflammatory site or a tumor site, and in other regions, its accumulation is prevented. In consideration of this, it is suitable as a vehicle for anti-inflammatory agent, anti-tumor agent or the like and has the effects of effectively causing the potency of the drugs to be exhibited and of alleviating their side effects.

Hereinafter, the present invention will be illustrated specifically along with examples. However, the present invention should not be limited thereto.

(Example 1)

Preparation of liposome comprising 3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride (basic compound) and myristic acid (fatty acid) as constituents
(1-[1]) First, a lipid mixed solution obtained by dissolving 4.62 mmol of phosphatidylcholine, 4.62 mmol of cholesterol, and 0.76 mmol of 3,5-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride in 100 ml of t-butyl alcohol was frozen in an ice bath and freeze-dried overnight to obtain a lipid mixture.

(1-[2]) 0.06 mmol of the lipid mixture obtained by the procedure in (1-[1]) was metered in a 50-ml eggplant type flask and 2 ml of a 1.14 mM myristic acid/chloroform solution was added thereto. After removal of the chloroform, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 6 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. This was extruded under pressure by use of a polycarbonate film with a pore size of 0.4- μ m, and then by use of a polycarbonate film with the pore size of 0.2- μ m and a polycarbonate film with the pore size of 0.1- μ m. Thus the entitled liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained. The entitled liposome dispersion comprising 7.3 mol% of the basic compound [1] of the present invention and 3.7 mol% of the acidic compound [2] of the present invention was obtained. The average particle size of the obtained liposome was 125.5 nm.

(Example 2)

Preparation of liposome comprising 3,5-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride and phosphatidic acid (phosphoric acid monoester derivative) as constituents

0.06 mmol of the lipid mixture obtained by the procedure in (1-[1]) was metered in a 50-ml eggplant type flask and 0.5 ml of a 1.14 mM phosphatidic acid/chloroform solution was added thereto. After removal of the chloroform, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask. To this, 6 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, the entitled liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm and comprising 7.5 mol% of the basic compound [1] of the present invention and 0.9 mol% of the acidic compound [2] of the present invention was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. The average particle size of the obtained liposome was 130.7 nm.

(Example 3)

Preparation of liposome comprising 3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride (basic compound) and sodium prednisolone phosphate (phosphoric acid monoester derivative) as constituents

To 0.6 mmol of the lipid mixture obtained by the procedure in (1-[1]) was added 10 ml of a 75-mM aqueous

THIS PAGE BLANK (USPTO)

sodium prednisolone phosphate solution and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. This was subjected by particle size selection by feeding it under pressure by use of a polycarbonate film with a pore size of 0.4- μ m, and then by use of a polycarbonate film with a pore size of 0.2- μ m and a polycarbonate film with a pore size of 0.1- μ m. The obtained liposome dispersion was applied to a column (Sephacrose 4 Φ 3cm \times 20 cm, eluent: physiological saline) to collect liposome fraction to obtain the entitled liposome dispersion having a particle size of 90 to 200 nm (average particle size 130.7 nm).

(Example 4)

Preparation of liposome comprising 3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride (basic compound) and sodium riboflavin phosphate (phosphoric acid monoester derivative) as constituents

To 0.6 mmol of the lipid mixture obtained by the procedure in (1-[1]) was added 10 ml of a 75-mM aqueous sodium riboflavin phosphate solution and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, the same operation as in Example 3 was followed to obtain the entitled liposome dispersion. The average particle size of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the obtained liposome was 117.9 nm

(Example 5)

Preparation of liposome comprising 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane (basic compound) and myristic acid (fatty acid) as constituents

25 μ mol of phosphatidylcholine, 25 μ mol of cholesterol, 25 μ mol of 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane and 25 μ mol of myristic acid were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.4-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then the mixture was heated at 60°C for 30 minutes to obtain the entitled liposome dispersion comprising 25 mol% of the basic compound [1] of the present invention, 25 mol% of the acidic compound [2] of the present invention, and 2 mol% of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative.

(Example 6)

Preparation of liposome comprising 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane (basic compound) and myristic acid (fatty acid) as constituents

20 μ mol of phosphatidylcholine, 20 μ mol of cholesterol, 30 μ mol of 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane and 30 μ mol of myristic acid were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.4-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then the mixture was heated at 60°C for 30 minutes to obtain the entitled liposome dispersion comprising 30 mol% of the basic compound [1] of the present invention, 30 mol% of the acidic compound [2] of the present invention, and 2 mol% of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative was obtained.

Preparation was tried in the same manner as above by use of 10 μmol of phosphatidylcholine, 10 μmol of cholesterol, 40 μmol of 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane, and 40 μmol of myristic acid. However, no liposome dispersion could be obtained.

(Example 7)

Preparation of liposome comprising 1,2-dipalmitoyl-3-dimethylammoniumpropane (basic compound) and palmitic acid (fatty acid)

35 μmol of phosphatidylcholine, 35 μmol of cholesterol, 20 μmol of 1,2-dipalmitoyl-3-dimethylammoniumpropane and 10 μmol of palmitic acid were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2])

THIS PAGE BLANK (USPTO)

above. Same volumes of a 0.4-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then the mixture was heated at 60°C for 30 minutes to obtain the entitled liposome dispersion comprising 20 mol% of the basic compound [1] of the present invention, 10 mol% of the acidic compound [2] of the present invention, and 2 mol% of polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative was obtained.

(Example 8)

Preparation of liposome comprising 1,2-dipalmitoyl-3-dimethylammoniumpropane (basic compound) and palmitic acid (fatty acid) as constituents

30 μ mol of phosphatidylcholine, 30 μ mol of cholesterol, 20 μ mol of 1,2-dipalmitoyl-3-dimethylammoniumpropane and 20 μ mol of palmitic acid were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90

THIS PAGE BLANK (USPTO)

to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.4-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then the mixture was heated at 60°C for 30 minutes to obtain the entitled liposome dispersion comprising 20 mol% of the basic compound [1] of the present invention, 20 mol% of the acidic compound [2] of the present invention, and 2 mol% of polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative was obtained.

(Example 9)

Preparation of liposome comprising 3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride (basic compound) and phosphatidic acid as constituents

44 μ mol of phosphatidylcholine, 44 μ mol of cholesterol, 10 μ mol of 3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride and 2 μ mol of phosphatidic acid were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.12-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then the mixture was heated at 60°C for 30 minutes to obtain the entitled liposome dispersion comprising 10 mol% of the basic compound [1] of the present invention, 2 mol% of the acidic compound [2] of the present invention, and 0.6 mol% of polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative was obtained.

(Comparative Example 1)

To 0.6 mmol of the lipid mixture obtained by the procedure above-mentioned in (1-[1]) was added 10 ml of physiological saline and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. This was processed in the same manner as in (1-[2]) above to obtain the entitled liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm. The average particle size of the obtained liposome was 110.5 nm.

(Comparative Example 2)

Preparation of liposome comprising 3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride and

THIS PAGE BLANK (USPTO)

phosphatidylglycerol as constituents

0.06 mmol of the lipid mixture obtained by the procedure above-mentioned in (1-[1]) was metered in a 50-ml eggplant type flask and 2 ml of a 1.14 mM phosphatidylglycerol/chloroform solution was added thereto. After removal of the chloroform, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask. To this, 6 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. This was processed in the same manner as in (1-[2]) above to obtain the entitled liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm. The average particle size of the obtained liposome was 138.8 nm.

(Comparative Example 3)

Preparation of liposome comprising 3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride and polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative as constituents

The lipid concentration of the liposome dispersion obtained in Comparative Example 1 was adjusted to 20 mM. To this liposome dispersion was added same volume of polyethylene glycol- phosphatidylethanolamine derivative solution (molecular weight : about 6,000, and concentration

THIS PAGE BLANK (USPTO)

: 1.214 mg/ml) and then the mixture was heated at 60°C for 30 minutes to obtain the entitled liposome dispersion having a particle size of 90 to 200 nm (average particle size : 117.4nm).

(Comparative Example 4)

Preparation of liposome comprising 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane (basic compound) as a constituent

37.5 μ mol of phosphatidylcholine, 37.5 μ mol of cholesterol, and 25 μ mol of 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.4-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then the mixture was heated at 60°C for 30 minutes to obtain the entitled liposome dispersion.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(Comparative Example 5)

Preparation of liposome comprising 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane (basic compound) as a constituent

35 μmol of phosphatidylcholine, 35 μmol of cholesterol, and 30 μmol of 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.4-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then the mixture was heated at 60°C for 30 minutes to obtain the entitled liposome dispersion.

(Comparative Example 6)

50 μmol of phosphatidylcholine, and 50 μmol of cholesterol were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.12-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then heated at 60°C for 30 minutes to obtain the liposome dispersion not comprising the basic compound [1] of the present invention and the acidic compound [2] of the present invention.

(Comparative Example 7)

45 μ mol of phosphatidylcholine, 45 μ mol of cholesterol, and 10 μ mol of 3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90

THIS PAGE BLANK (USPTO)

to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.12-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then heated at 60°C for 30 minutes to obtain the liposome dispersion.

(Comparative Example 8)

49 μ mol of phosphatidylcholine, 49 μ mol of cholesterol, and 2 μ mol of phosphatidic acid were dissolved in 10 ml of chloroform and then the chloroform was removed by use of an evaporator. Thereafter, the mixture was dried under vacuum overnight to form a lipid thin film on the inner wall of the flask.

To this, 5 ml of physiological saline was added and the mixture was subjected to ultrasonication at 55°C for 5 minutes to obtain a liposome dispersion. Subsequently, a liposome dispersion having an average particle size of 90 to 200 nm was obtained in the same manner as in (1-[2]) above. Same volumes of a 0.12-mM polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine derivative saline solution and of the liposome dispersion were added and then heated at 60°C for 30 minutes to obtain the liposome dispersion comprising an anionic lipid.

(Test Example 1) Affinity of various kinds of liposomes for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

proteoglycan

The purpose of this test was to examine the affinity of liposome for proteoglycan overproduced at an inflammatory site or a tumor site under acidic condition and in the vicinity of neutrality.

(Method)

Glycosaminoglycan serving as an anionic sugar chain polymer, contained in a proteoglycan was mixed with liposome in each of Examples and Comparative Examples and the amount of glycosaminoglycan adsorbed on each liposome was measured. Chondroitin sulfate C (molecular weight : 30,000 to 60,000) as the glycosaminoglycan was dissolved in a phosphate buffer at pH 7.4 and adjusted to 0.1 mg/ml and further adjusted to pH 6.0 or pH 6.5 with 6N HCl. 0.3 ml of the obtained 0.1 mg/ml chondroitin sulfate C solution at pH 7.4 or pH 6.0 and 0.3 ml of each liposome dispersion of which the lipid concentration was adjusted to 10 mM with physiological saline were mixed and heated at 37°C for 1 hour. After cooling, ultracentrifugation was performed at 100,000 g for 1 hour and the supernatant was collected. Chondroitin sulfate C in the supernatant was determined by use of a Blyscan proteoglycan assay kit and the amount of adsorption of chondroitin sulfate C to each liposome was calculated.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(Results)

The results are shown in Figs. 1 to 3. The liposomes in Comparative Example 1 in which no acidic compound was comprised and Comparative Examples 2 to 5 and 7 in which the acidic compound was a phosphodiester had the same adsorption amount of chondroitin sulfate C at pH 6.0 or 6.5, and pH 7.4. The liposomes in Comparative Examples 6 and 8 in which no basic compound was comprised did not adsorb any chondroitin sulfate C at pH 6.5 and pH 7.4. It was confirmed that the liposomes in accordance with Examples 1 to 9 of the present invention showed some difference in the adsorption amount for chondroitin sulfate C between pH 6.0 or 6.5 and pH 7.4 and at pH 7.4, the adsorption amount was suppressed. That is, it was observed that the liposomes of the present invention had suppressed affinity for proteoglycan in the vicinity of neutrality while in acidic environment it showed high affinity therefor.

(Test Example -2) Evaluation of affinity for cells of various kinds of liposomes

(Method)

Human aorta smooth muscle primary culture cell (produced by Clonetics) was spread on 12-well culture plate

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(Falcon, produced by Becton Dickinson) to 3.8×10^4 cells/well and incubated for 24 hours. The medium was changed to RPMI1640 (produced by Sigma)/10% FBS (pH 6.0 or pH 7.4) (1 ml/well), and the liposomes of Example 9 and Comparative Examples 6 to 8 were added respectively in amounts of 50 μ g PC/well and allowed to incubate for 24 hours (n=3). After washing with PBS(-) twice, the cells were lysed with a cytolytic agent (50 mM Tris (pH 8.0)/150 mM, NaCl/0.5% DOC/1% NP-40/0.1% SDS) and the fluorescence intensity was measured. PC concentration was converted from the fluorescence intensity and corrected with the amount of protein. Then the binding amount of each liposome to cell was calculated.

(Results)

The results are shown in Fig. 4. The liposome of Comparative Example 7 had approximately the same binding amount to cell at pH 6.0 and at pH 7.4. The liposomes of Comparative Examples 6 and 8 did not bind to the cells at pH 6.0 or at pH 7.4. It was confirmed that the liposome in accordance with Example 9 of the present invention showed a difference in the binding amount to the cells between pH 6.0 or 6.5 and pH 7.4 and had a suppressed binding amount at pH 7.4. That is, it was observed that the liposomes of the present invention had suppressed affinity for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

proteoglycan in the vicinity of neutrality while in acidic environment it showed high affinity therefor.

(Test Example 3) Acute Toxicity

The purpose of this test was to know the degree of toxicity of the liposome of the present invention as compared with the conventional ones. For this purpose, lethal toxicity tests of the liposome of the present invention on rats were performed.

(Method)

The liposome dispersions of Examples 1 to 9 were concentrated by use of an ultrafiltration membrane and optionally diluted with sterilized distilled water for injection as needed to make test solutions. Quarantined 5-week aged mice were divided into groups of 5 animals per group and 100 ml/kg of the test solution was administered to mice via the tail vein. On the other hand, the solvent control group was administered with 100 ml/kg of physiological saline. After the administration of the test solution, the general condition was carefully observed at least once a day for 7 days and indication of toxicity and death case were recorded. Also, 7 days after administration, autopsy was performed to remove respective organs. Pathological sections were prepared for each organ

THIS PAGE IS BLANK

and observation was performed thereon.

(Results)

No death case was observed during the observation period in the case of the liposomes of the present invention. In the histopathological observation of each organ after 7 days, no histopathological change was observed. That is, it was confirmed that the liposomes of the present invention were extremely low in toxicity and high in safety.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

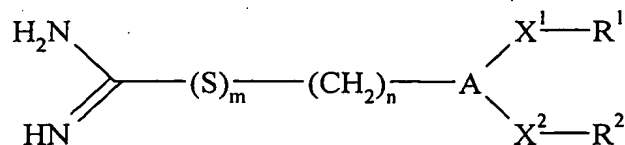
The liposomes of the present invention are very high in targeting capability at a diseased site such as inflammation and tumor where pH has been decreased in acidic regions. Also, they are very high in safety.

Therefore, the liposomes of the present invention that carry a drug for the diagnosis and/or therapy are very effective for the purpose of the diagnosis and therapy of tissues and/or organs where inflammation or tumor lesion has occurred.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Claims

1. A liposome that includes a drug intended for the therapy and/or diagnosis, comprising as membrane constituents [1] a basic compound, [2] an acidic compound which is a phosphoric acid monoester derivative, or a compound having a carboxyl group or its salt, and [3] a liposome membrane constituent other than [1] and [2], that is accumulated at a diseased site at pH 5 to 7.
2. The liposome according to claim 1, wherein a molar ratio of said basic compound is 1 to 30 mol% of total liposome membrane constituents.
3. The liposome according to claim 1 or 2, wherein a molar ratio of said acidic compound is 0.5 to 30 mol% of total liposome membrane constituents.
4. The liposome according to any one of claims 1 to 3, wherein said basic compound is represented by any one of the following Formulae 1 to 4:

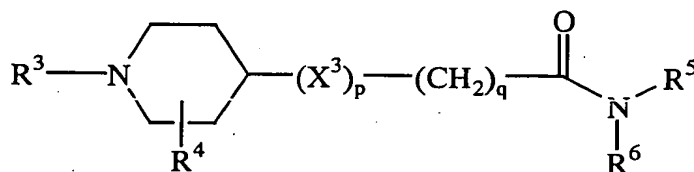


Formula 1

(in Formula 1, A represents an aromatic ring. R¹ and R²

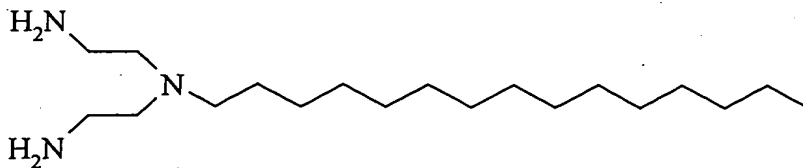
THIS PAGE BLANK (USPTO)

represent an alkyl group or alkenyl group having 10 to 25 carbon atoms, where R^1 and R^2 may be the same or different. X^1 and X^2 represent $-O-$, $-S-$, $-COO-$, $-OCO-$, $-CONH-$ or $NHCO-$, where X^1 and X^2 may be the same or different. m is 0 or 1, and n is 0 or an integer of 1 to 6.)

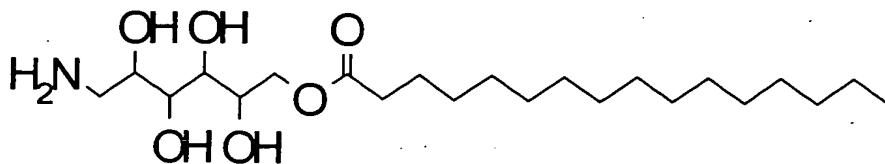


Formula 2

(in Formula 2, R^3 represents hydrogen or an alkyl group or alkenyl group having 1 to 8 carbon atoms. R^5 and R^6 represent hydrogen, or an alkyl group or alkenyl group having 1 to 25 carbon atoms, (except for the case where both R^5 and R^6 are hydrogen atoms), where R^5 and R^6 may be the same or different. X^3 represents $-O-$ or $-S-$. p is 0 or 1, and q is 0 or an integer of 1 to 10).



Formula 3

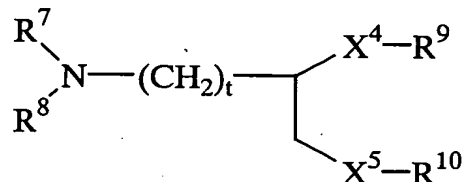


Formula 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

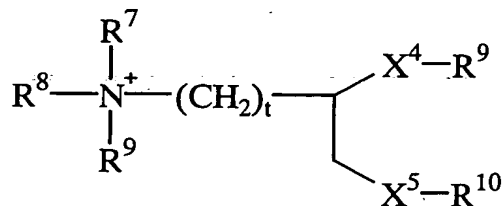
5. The liposome according to any one of claims 1 to 4, wherein said basic compound is a basic compound having a quaternary amine or a tertiary amine.

6. The liposome according to any one of claims 1 to 5, wherein said basic compound is selected from the group consisting of the following Formulae 5 and 6.



Formula 5

(in Formula 5, R^7 and R^8 represent an alkyl group or alkenyl group having 1 to 8 carbon atoms, where R^7 and R^8 may be the same or different. X^4 and X^5 represent $-\text{O}-$ or $-\text{OCO}-$, where X^4 and X^5 may be the same or different. R^9 and R^{10} represent an alkyl group or alkenyl group having 10 to 20 carbon atoms, where R^9 and R^{10} may be the same or different. t is an integer of 1 to 6.)



Formula 6

(in Formula 6, R^7 , R^8 and R^9 represent an alkyl group or

THIS PAGE BLANK (USPTO)

alkenyl group having 1 to 8 carbon atoms, where R^7 , R^8 and R^9 may be the same or different. X^4 and X^5 represent -O- or -OCO-, where X^4 and X^5 may be the same or different. R^9 and R^{10} represent an alkyl group or alkenyl group having 10 to 20 carbon atoms, where R^9 and R^{10} may be the same or different. t is an integer of 1 to 6.).

7. The liposome according to any one of claims 1 to 6, wherein said phosphoric acid monoester derivative is selected from predonisolone phosphate, riboflavin phosphate, and phosphatidic acid.

8. The liposome according to any one of claims 1 to 7, wherein said compound having a carboxyl group or its salt, is a fatty acid.

9. The liposome according to any one of claims 1 to 8, wherein said fatty acid is oleic acid, stearic acid, palmitic acid, or myristic acid.

10. The liposome according to any one of claims 1 to 9, wherein the liposome membrane constituent other than [1] and [2], is phospholipid or its derivative, and/or sterol or its derivative.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11. The liposome according to any one of claims 1 to 10, wherein said drug intended for the therapy and/or diagnosis is an anti-cancer agent, an antibiotic, an enzyme agent, an enzyme inhibitor, an antioxidant, a lipid uptake inhibitor, a hormone agent, an anti-inflammatory agent, a steroid agent, a vasodilator, an angiotensin converting enzyme inhibitor, an angiotensin receptor antagonist, a growth/migration inhibitor for smooth muscle cells, a platelet aggregation inhibitor, an anticoagulant, a chemical mediator releasing inhibitor, a vascular endothelial cell growth or suppressing agent, an aldose reductase inhibitor, a mesangium cell growth inhibitor, a lipoxygenase inhibitor, an immunosuppressor, an immunoactivator, an antiviral agent, a Maillard reaction inhibitor, an amyloidosis inhibitor, an NOS inhibitor, an AGEs inhibitor, or a radical scavenger.

12. The liposome according to any one of claims 1 to 10, wherein said drug intended for the therapy and/or diagnosis is a nucleic acid, a polynucleotide, a gene and its analogue.

13. The liposome according to any one of claims 1 to 10,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wherein said drug intended for the therapy and/or diagnosis is glycosaminoglycan and its derivative.

14. The liposome according to any one of claims 1 to 10, wherein said drug intended for the therapy and/or diagnosis is oligo- and/or polysaccharide, and derivative thereof.

15. The liposome according to any one of claims 1 to 10, wherein said drug intended for the therapy and/or diagnosis is protein or peptide.

16. The liposome according to any one of claims 1 to 10, wherein said drug intended for the therapy and/or diagnosis is an intracorporeal diagnostic drug such as an X-ray contrasting medium, a radiolabeled nuclear medicinal diagnostic drug, or a nuclear magnetic resonance diagnostic drug for diagnosis.

17. A method of increasing a ratio of accumulation of liposome at a diseased site, comprising adding to a liposome membrane constituent including a drug for a therapy and/or diagnosis [1] a basic compound and [2] an acidic compound, which is a phosphoric acid monoester derivative, or a compound having a carboxyl group or its

THIS PAGE BLANK (USPTO)

salt, such that a ratio of an adsorption amount of chondroitin sulfate C to liposome in a phosphate buffer of pH 6.5 to that in a phosphate buffer of pH 7.4 is at least 1.5.

18. A method for the therapy and/or diagnosis, comprising administering to an animal including a human a liposome including a drug intended for the therapy and/or diagnosis comprising as liposome membrane constituents [1] a basic compound, [2] an acidic compound, which is a phosphoric acid monoester derivative, or a compound having a carboxyl group or its salt, and [3] a liposome membrane constituent other than [1] and [2] to accumulate it at a diseased site at a pH of 5 to 7.

19. A method of using a liposome including a drug intended for the therapy and/or diagnosis comprising as liposome membrane constituents [1] a basic compound, [2] an acidic compound, which is a phosphoric acid monoester derivative, or a compound having a carboxyl group or its salt, and [3] a liposome membrane constituent other than [1] and [2] for accumulating the drug intended for the therapy and/or diagnosis at a diseased site at a pH of 5 to 7.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ABSTRACT

Drug carriers that includes a drug, being very high in targeting capability at a diseased site such as an inflammatory site or a tumor site where pH has been decreased in acidic regions. A liposome, comprising as membrane constituents [1] a basic compound, [2] an acidic compound which is a phosphoric acid monoester derivative, or a compound having a carboxyl group or its salt, and [3] other liposome constituent.

THIS PAGE BLANK (USPTO)